

SINIMAILASEN (*MEDICAGO SATIVA* L.) KYLMÄNKESTÄVYYS

Ville Alitalo
Maisterintutkielma
Helsingin yliopisto
Maataloustieteiden laitos
Kasvinviljelytiede
Huhtikuu 2018

Tiedekunta/Osasto — Fakultet/Sektion — Faculty Maatalous-metsätieteellinen tiedekunta		Laitos — Institution — Department Maataloustieteiden laitos	
Tekijä — Författare — Author Ville Alitalo			
Työn nimi — Arbetets titel — Title Sinimailasen (<i>Medicago sativa</i> L.) kylmänkestävyys			
Oppiaine — Läroämne — Subject Kasvinviljelytiede			
Työn laji — Arbetets art — Level Maisterintutkielma		Aika — Datum — Month and year Huhtikuu 2018	Sivumäärä — Sidoantal — Number of pages 57 s.
<p>Tiivistelmä — Referat — Abstract</p> <p>Sinimailanen (<i>Medicago sativa</i> L.) on kiinnostava kasvi nurmiseoksiin satoisuutensa, korkean typensidontapotentiaalinsa, maittavuutensa ja hyvän rehuarvonsa vuoksi. Sitä on kuitenkin pidetty hankalana viljellä Suomessa korkean pH-vaatimuksen, huonon märkyyden- ja tallauksenkestävyyden sekä heikoksi mielletyn talvenkestävyyden vuoksi. Ojituksella, kalkituksella ja peltoliikenteen suunnittelulla voidaan vaikuttaa muihin kasvuoloihin, mutta ei talven olosuhteisiin.</p> <p>Tämän tutkimuksen tavoitteena oli selvittää eri alkuperää ja syysdormanssiluokkaa olevien sinimailaslajikkeiden eroja kylmänkestävyydessä ja karaistumisnopeudessa, sekä tutkia, vaikuttavatko juurten ja versojen sokeri- ja tärkkelyspitoisuudet mahdollisiin eroihin. Tavoitteena oli myös arvioida lajikkeiden soveltuvuutta Suomessa viljeltäviksi kylmänkestävyytensä puolesta. Tutkimukseen kuuluivat pelto- ja kasvatuskaappikoe. Peltokokeessa olivat mukana sinimailaslajikkeet 'Alexis', 'Nexus', 'Live' ja 'Lavo' ja kasvatuskaappikokeessa näiden lisäksi 'Hunter river' ja 'Rangelander'. Peltokokeessa näytteitä kerättiin lokakuusta alkaen kahden kuukauden välein yhteensä neljä kertaa talven 2014-2015 aikana. Kasvatuskaappikokeessa kasveja altistettiin kahdelle kolmen viikon mittaiselle karaistumiskäsittelylle; toisessa käsittelyssä päivälämpötila oli 7 °C ja yölämpötila 3 °C koko käsittelyn ajan, toisessa päivälämpötila laskettiin 5 °C:een ja yölämpötila -2 °C:een viimeisen viikon ajaksi. Molemmissa kokeissa kasvien kylmänkestävyys määritettiin ionivuototestillä, peltokokeessa juurista ja kasvatuskaappikokeessa juurista ja lehdistä. Lisäksi määritettiin juurien ja versojen kuiva-aine-, sokeri- ja tärkkelyspitoisuudet.</p> <p>Tulokset osoittivat sinimailasen kestävän hyvin hetkellisiä kylmiä lämpötiloja, sillä kylmimmissäkään (peltokoe -18 °C, kasvatuskaappikoe -16 °C) testilämpötiloissa ei saavutettu karaistuneille kasveille kaikille lajikkeille 50 % ionivuotoa, jolloin kasvien katsotaan olevan kuolleita. Kasvatuskaappikokeessa pakkaslämpötila tehosti karaistumista ja lajikkeiden välillä havaittiin merkitseviä eroja kylmänkestossa. Karaistuminen nosti kasvien juurten sokeripitoisuutta ja laski tärkkelyspitoisuutta sekä pelto-, että kasvatuskaappikokeessa. Lajikkeiden väliset erot eivät olleet kuitenkaan merkitseviä peltokokeessa. Versojen sokeripitoisuudessa lähinnä parhaiten ja huonoiten kylmää kestävät lajikkeet erosivat merkitsevästi toisistaan. Yksivuotisen kokeen perusteella kaikki peltokokeessa mukana olleet lajikkeet soveltuivat hyvin viljelyyn.</p>			
Avainsanat — Nyckelord — Keywords sinimailanen, kylmänkestävyys, sokeri, tärkkelys, ionivuoto, karaistuminen			
Säilytyspaikka — Förvaringsställe — Where deposited Maataloustieteiden laitos ja Viikin kampuskirjasto			
Muita tietoja — Övriga uppgifter — Further information Työtä ohjasivat MMT Mervi Seppänen, MMT Venla Jokela ja MMT Hamid Khazaei			

HELSINGIN YLIOPISTO — HELSINGFORS UNIVERSITET — UNIVERSITY OF HELSINKI

Tiedekunta/Osasto — Fakultet/Sektion — Faculty Faculty of Agriculture and Forestry		Laitos — Institution — Department Department of Agricultural Sciences	
Tekijä — Författare — Author Ville Alitalo			
Työn nimi — Arbetets titel — Title Cold tolerance of alfalfa (<i>Medicago sativa</i> L.)			
Oppiaine — Läroämne — Subject Crop science			
Työn laji — Arbetets art — Level Master's thesis		Aika — Datum — Month and year April 2018	Sivumäärä — Sidoantal — Number of pages 57 p.
Tiivistelmä — Referat — Abstract <p>Alfalfa (<i>Medicago sativa</i> L.) is an interesting plant in grass mixtures because of its high yield and nitrogen fixing potential, and also high acceptance and forage value in animals. However, it is considered challenging to cultivate in Finland because of its high pH requirement and its poor ability to stand wet soil, trampling and cold winter. By ditching, liming and good management of field traffic it is possible to improve all these difficult growth conditions except for cold winter.</p> <p>The aim of this study was to investigate the differences in cold hardiness and the rate of cold hardening on six alfalfa cultivars having different origin and fall dormancy class. The aim was also to examine if the observed potential differences result from dry matter, starch and soluble sugar content in plant roots and shoots. Based on these traits, it was also intended to evaluate the suitability of tested cultivars for cultivation in Finland. The study composed of a field and a growth chamber experiment. In the field experiment the alfalfa cultivars 'Alexis', 'Nexus', 'Live' and 'Lavo' were tested, and in the growth chamber experiment also cultivars 'Hunter river' and 'Rangelander' were included. In the field experiment the samples were taken in total four times during winter 2014-2015. Sampling was done every other month starting from October. In the growth chamber experiment the plants were cold acclimated at two different programmes; 7/3 °C at day/night for three weeks and 7/3 °C for two weeks followed 5/-2 °C for one week. The cold hardiness of plants was determined by ion leakage test, in the field experiment from roots and in growth chamber experiment from roots and leaves. The dry matter content, soluble sugar content and starch content were also determined from roots and shoots in both experiments.</p> <p>The results showed that alfalfa plants tolerate well short cold temperatures. The 50 percent ion leakage, when plants are regarded to be dead, was not achieved with all cultivars, although the coldest freezing temperatures used in the artificial freezing test was -18 °C for the field and -16 °C in the growth chamber experiment. Freezing temperatures strengthened the hardening of plants in growth chamber trial and significant differences in cold tolerance were observed between cultivars. Hardening increased the soluble sugar content and decreased the starch content of plant roots in both experiments, but the differences between cultivars were not significant. Significant differences in sugar content of shoots were observed only between the cultivars with best and poorest freezing tolerance. According to the results of one-year field experiment all cultivars were suitable for cultivation in Finland.</p>			
Avainsanat — Nyckelord — Keywords alfalfa, <i>Medicago sativa</i> , freezing tolerance, sugar, starch, ion leakage, hardening			
Säilytyspaikka — Förvaringsställe — Where deposited Department of Agricultural Sciences and Viikki Campus Library			
Muita tietoja — Övriga uppgifter — Further information Supervisors: PhD Mervi Seppänen, PhD Venla Jokela and PhD Hamid Khazaei			

Sisällys

1 Johdanto.....	6
2 Sinimailanen ja sen kylmänkesto.....	7
2.1 Sinimailanen viljelykasvina	7
2.2 Kasvien talven ja kylmyyden kesto	9
2.2.1 Jäätyminen.....	10
2.2.2 Jäätymisen aiheuttamat vauriot	11
2.2.3 Karaistuminen.....	12
2.2.4 Karaistumisen ja kylmänkeston tutkiminen	14
2.2.5 Sinimailasen syysdormanssi ja talvenkesto	15
3 Tutkimuksen tavoitteet.....	16
4 Aineisto ja menetelmät	16
4.1 Käytetty kasvimateriaali ja koejärjestelyt.....	16
4.1.1 Peltokoe	16
4.1.2 Kasvatuskaappikoe	17
4.2 Kokeiden aikana tehdyt havainnot	19
4.2.1 Peltokoe; säähavainnot ja talvituhot.....	19
4.2.2 Kasvatuskaappikokeen aikana tehdyt havainnot.....	20
4.3 Kylmänkestävyyden mittaaminen.....	20
4.3.1 Peltokoe	20
4.3.2 Kasvatuskaappikoe	22
4.4 Liukoisten sokerien pitoisuuden määrittäminen	23
4.5. Tärkkelyspitoisuuden määrittäminen.....	25
4.6 Tulosten tilastollinen käsittely	26
5 Tulokset.....	27
5.1 Kokeiden aikana tehdyt havainnot	27
5.1.1 Sääolot ja karaistuminen sekä talvituhot peltokokeessa.....	27
5.1.2 Kasvien kasvun seuranta kasvatuskaappikokeessa	28
5.2 Kylmänkestävyys	30
5.2.1 Peltokoe	30
5.2.2 Kasvatuskaappikoe	32
5.3 Kuiva-aineen, sokerin ja tärkkelyksen pitoisuuksien muutokset.....	38
5.3.1 Peltokoe	38

5.3.2 Kasvatuskaappikoe	40
6 Tulosten tarkastelu.....	42
6.1 Karaistuminen.....	42
6.2 Kylmänkestävyys	44
6.3 Kuiva-aineen kertyminen	45
6.4 Liukoisten sokerien pitoisuus	45
6.5 Tärkkelyspitoisuus.....	46
7 Johtopäätökset.....	47
8 Kiitokset	49
LÄHTEET	50

1 Johdanto

Suomeen joudutaan tuomaan merkittäviä määriä rehuvalkuaisista ulkomailta, koska kotimainen valkuaiskasvien viljely ei riitä kattamaan kotieläintuotannon tarvetta. Viljan viljely tuottaa hieman alle puolet kotimaisesta kasvivalkuaisesta, nurmikasvit 46 % ja muut kasvit, kuten peruna (*Solanum tuberosum* L.), rypsi (*Brassica rapa* ssp. *oleifera* (DC.) Metzg.) ja rapsi (*Brassica napus* ssp. *oleifera* (Moench) Metzg.) loput 5 % (Kaukovirta-Norja ym. 2015). Suomessa kasviperäisen valkuaisen omavaraisuusaste on noin 90 %, mutta niin sanotusta täydennysvalkuaisesta eli käytännössä eläinten väkirehuun tarvittavasta valkuaisesta kotimainen tuotanto kattaa vain 15 % (Kaukovirta-Norja ym. 2015). Keinona omavaraisuuden parantamiseksi voidaan pyrkiä lisäämään valkuaiskasvien, esimerkiksi rypsin ja härkäpavun (*Vicia faba* L.) viljelyalaa, mutta myös vähentää täydennysvalkuaisen tarvetta viljelemällä naudoille aiempaa valkuaispitoisempaa nurmea. Sinimailasen (*Medicago sativa* L.) viljelyn lisääminen olisi yksi keino tähän. Dewhurst ym. (2003) totesivat nurmipalkokasvisäilörehun sisältävän 40-86 % enemmän raakavalkuaisista, kuin vastaavan heinäsäilörehun. Suomessa käytössä olevien rehutaulukoiden (MTT 2013) mukaan puhtaan sinimailassäilörehun raakavalkuaispitoisuus korjuuajankohdasta riippuen on 185-230 g/kg ka, kun se heinäkasvisäilörehussa on 120-170 g/kg ka. Rehutaulukoiden mukaan myös apilasäilörehun raakavalkuaispitoisuus on samaa luokkaa (MTT 2013), mutta apiloiden (*Trifolium* sp.) sinimailasta matalampi satotaso (Halling ym. 2004) ja heikompi säilyvyys nurmiseoksissa (Kunelius ym. 2006) kannustaisi nimenomaan sinimailasen viljelyn lisäämiseen.

Typensitojakasvina sinimailasen lisääminen viljelykiertoon voisi myös tuoda viljelijöille huomattavia säästöjä lannoituskustannuksiin. Tämä voi olla korkeaa valkuaispitoisuuttakin suurempi kannustin sinimailasen viljelyyn, sillä vaikka sinimailasrehun valkuaispitoisuus onkin heinäkasvirehua suurempi, valkuaisen hyväksikäyttöaste on heikompi (Dewhurst ym. 2003). Heikko hyväksikäyttö johtuu valkuaisen suuresta pötsihajoavuudesta ja sinimailassäilörehun matalasta energiapitoisuudesta suhteessa hajoavan valkuaisen osuuteen, jolloin ammoniakiksi hajonnut valkuainen ei ehdi muodostua mikrobivalkuaiseksi, vaan imeytyy verenkiertoon ja poistuu ureana virtsan mukana (Buxton 1996, MTT 2013).

Lannoituksessa saatava säästö sen sijaan voi olla huomattava; esimerkiksi Wivstad ym. (1987) määrittivät sinimailasnurmen vuotuiseksi typensidonnaksi Ruotsissa 242-319 kg N/ha, Danso ym. (1988) Itävallassa 104-108 kg N/ha ja Heichel ym. (1984) Yhdysvalloissa 112-224 kg N/ha. Teoriassa sinimailasen typensidonta voisi siis hyvissä olosuhteissa kattaa koko nurmen typpilannoitustarpeen, tosin käytännössä seoskasvustoissa tähän lienee vaikeaa päästä; Ledgardin ja Steelen (1992) yhteenvedossa kolmesta eri tutkimuksesta sinimailanen siirsi typpeä seoskumppanina olevalle heinälle vain 3-27 kg/ha vuodessa.

Suomessa sinimailasen viljelyä rajoittavat etenkin maaperän happamuus, märkyys ja pitkä kylmä talvi. Lisäksi kasvusto kärsii helposti erityisesti märissä oloissa tapahtuvasta tallauksesta. Sinimailanen viihtyy ja sitoo typpeä parhaiten maan pH:n ollessa noin 6,5-7,5 (Lanyon ja Griffith 1988, Barnes ja Sheaffer 1995). Suomessa peltomaan pH on Eurofins Viljavuuspalvelu oy:n (2016) vuosina 2006-2010 analysoimissa maanäytteissä ollut keskimäärin 6,03. Tämä on kuitenkin korjattavissa kalkitsemalla maata riittävästi ennen sinimailasen viljelyn aloittamista. Märkyys torjumiseksi puolestaan voidaan sinimailaslohkon ojitus kunnostaa ja valita poutivia maita sinimailasen viljelyyn. Tallaukseenkin voidaan vaikuttaa peltoliikenteen suunnittelun avulla. Sen sijaan talven pituuteen ja kylmyyteen ei voida vaikuttaa, joten on keskityttävä itse kasvin ominaisuuksiin.

2 Sinimailanen ja sen kylmänkesto

2.1 Sinimailanen viljelykasvina

Sinimailanen (*Medicago sativa* L.) on maailman eniten viljelty lauhkean vyöhykkeen nurmipalkokasvi (Small 2011). Sen alkuperä on nykyisen Lähi-idän alueella, mistä sen viljely levisi Kiinaan, Intiaan, Kreikkaan, Rooman valtakunnan alueelle ja Pohjois-Afrikan kautta Espanjaan (Bolton 1962). Espanjasta ja Roomasta se levisi edelleen muualle Eurooppaan ja Venäjälle ja sittemmin löytöretkeilijöiden mukana Amerikkaan (Bolton 1962). Nykyisin sitä viljellään lauhkealla vyöhykkeellä kaikkialla maailmassa ja eri lajikkeet ovat sopeutuneet hyvin erilaisiin ilmastoihin (Small 2011). Sinimailasen lisäksi sen lähisukulaisia sirppimailasta (*M. falcata* L.) ja edellisten risteymää rehumailasta (*M. × varia* Martyn) viljellään yleisesti nurmirehuksi. Toisinaan nämä

lähilajit mainitaan kirjallisuudessa myös sinimailasen alalajeina (*M. sativa* ssp. *sativa*, *M. sativa* ssp. *falcata* ja *M. sativa* ssp. \times *varia*). Vaikka rehumailanen tunnetaan omana lajinaan, useimmat sinimailaslajikkeetkin (etenkin kylmää hyvin kestävät) sisältävät itse asiassa myös sirppimailasen perimää (Michaud ym. 1988).

Kuten palkokasvit yleensäkin, sinimailanen on typensitojakasvi, eli muodostaa ilmakehän tyypeä epäorgaaniseen muotoon sitovia juurinystyröitä yhdessä *Sinorhizobium meliloti* -typensitojabakteerin kanssa (Vance ym. 1988). Typensidonnan ansiosta teollisten mineraalilannoitteiden käyttöä voidaan vähentää ja näin hillitää kasvihuonekaasupäästöjä. Esimerkiksi maidontuotannossa typpilannoitteet ovat suurin yksittäinen kasvihuonekaasupäästöjen lähde lypsykarjan rehun tuotannossa, mikäli karjan ruokinnassa käytetään jotakin muuta kuin palkokasvisäilörehua (Adom ym. 2012). Suomessa väkilannoitteet aiheuttivat 18,5 % maatalouden kaikista päästöistä vuosina 1990-2014 (FAOSTAT 2016). Biologinen typensidonta aiheuttaa myös jonkin verran kasvihuonekaasupäästöjä, mutta silti esimerkiksi sinimailassäilörehun viljely aiheuttaa kuiva-ainekiloa kohti vain noin puolet heinäkassäilörehun kasvihuonekaasupäästöistä (Adom ym. 2012). Väkilannoitetyypen korvaaminen ilmasta sidotulla tyypellä alentaa myös nurmenviljelyn tuotantokustannuksia mikä parantaa osaltaan maatalojen taloudellista kannattavuutta (Frame ym. 1998).

Sinimailasta voi viljellä joko puhdaskasvustona tai seoksena esimerkiksi nurmiheinien kanssa. Vaikka maailmalla sinimailasta viljelläänkin useimmiten puhdaskasvustoina (Frame ym. 1998), seoskasvustossa viljelyä voi pitää ainakin Suomen oloissa suositeltavampana vaihtoehtona. Seoskasvusto lisää viljelyvarmuutta; jos seoksen jokin kasvi kuolee esimerkiksi ankaran talven seurauksena, muut kasvilajit voivat säästyä ja ensimmäistä satoa ei menetetä kokonaan. Esimerkiksi sinimailasen hävitessä nurmesta heinät valtaavat sen tilan varmistaen satoa ja estäen rikkakasvien lisääntymistä (Teasar ja Marble 1988). Seoskasvusto heinien kanssa parantaa myös talvenkestoa verrattuna puhtaaseen sinimailaskasvustoon (Bélanger ym. 2006). Heinien lisäksi seoksessa voidaan käyttää myös muita nurmipalkokasveja, kuten puna- (*Trifolium pratense* L.) tai valkoapilaa (*T. repens* L.), etenkin jos on epäily sinimailasen sopivuudesta kyseisen lohkon olosuhteisiin (Teasar ja Marble 1988). Jos sinimailanen häviää nurmesta, toiseen ja kolmanteen satoon voidaan vaikuttaa myös täydennyskylvöillä. Sinimailanen on kuitenkin autotoksinen, eli sinimailaskasvusto estää uusien oman lajin siementen

itämisen. Teasarin ja Marblen (1988) mukaan kynnön jälkeen tulisi pitää kahden ja herbisidilopetuksen jälkeen kolmen viikon väli ennen uuden sinimailaskasvuston perustamista. Jennings ja Nelson (2002) puolestaan suosittelevat vähintään 12 kuukauden väliä kasvuston lopetuksen ja uuden kylvön välillä. Täydennyskylvöön onkin syytä käyttää jotakin muuta kasvia, kuten apiloita ja nurmiheiniä.

Nurmiseoksissa sato on usein puhdaskasvustoja suurempi. Bélanger ym. (2014) saivat neljän vuoden kokeessaan timotein (*Phleum pratense* L.) ja sinimailasen seoskasvustosta keskimäärin 8,1% suuremman kuiva-ainesadon kuin sinimailasen puhdaskasvustosta rehun sulavuuden kuitenkaan heikentymättä. Lisäksi seoskasvusto vähensi rikkakasveja ja typen suhde liukoisiin hiilihydraatteihin oli edullisempi lehmille. Sturludóttirin ym. (2013) tulokset olivat hyvin samanlaisia; erilaisista timotein, niittynurmikan (*Poa pratensis* L.) sekä puna- ja valkoapilan seoskasvustoista saatiin ruokinnallisen laadun heikentymättä 7 - 15% suurempi kuiva-ainesato, kuin parhaasta näiden neljän lajin puhdaskasvustosta. Lisäksi rikkakasvien määrä pysyi seoskasvustoissa pienempänä kuin puhdaskasvustoissa. Myös Thompson (2013) sai sinimailas-heinäkasvustoista keskimäärin 9% suurempia kuiva-ainesatoja kuin parhaista nurminata- (*Festuca pratensis* Huds.) tai koiranheinäpuhdaskasvustoista (*Dactylis glomerata* L.), vaikka typpilannoitusta oli annettu seoskasvustoille vain puolet puhdaskasvustoille annetusta määrästä. Seoskasvusto voi myös tehostaa typensidontaa; Nyfeler ym. (2011) huomasivat apila-heinäseoskasvustoissa sekä biologisen typensidonnan, että mineraalitypen oton maasta tehostuvan verrattuna apilan puhdaskasvustoihin.

2.2 Kasvien talven ja kylmyyden kesto

Talvenkestolla tarkoitetaan kasvien kykyä selvitä talven yli (Lindén ym. 1999). Kylmyydenkestolla puolestaan tarkoitetaan kasvien kykyä selvitä kylmistä olosuhteista ja jäätyminenkestolla kasvien kykyä selvitä lämpötilan laskemisesta pakkasen puolelle. Talvenkestävyys muodostuu kylmän- ja jäätyminenkeston lisäksi kaikkien muiden talvella vaikuttavien bioottisten ja abioottisten stressien, kuten talviaikaisten kasvitautilien ja lämpötilavaihteluiden yhteisvaikutuksesta kasvien selviytymiseen (Lindén ym. 1999). Vaikka kasvinviljelyn kannalta merkitystä on lähinnä

talvenkestolla, jäätymisenkesto vaikuttaa oleellisesti talvenkestoon (Bélanger ym. 2006). Tämä tekee jäätymisenkestosta tärkeän osa-alueen tutkittaessa kasvien kykyä selvitä talven yli.

Kasvit voivat kokea kahdenlaista kylmästressiä; viluuntumista (chilling), jossa kasvi kärsii matalista lämpötiloista, jotka kuitenkin ovat 0 °C yläpuolella, sekä jäätymisstressiä (freezing), jossa lämpötila laskee pakkaselle. Viluuntuminen aiheuttaa vaurioita lähinnä lämpimään ilmastoon sopeutuneissa kasveissa, jotka kestävät pakkasta hyvin vähän tai eivät lainkaan. Sen sijaan viileämpään ilmastoon sopeutuneille kasveille vaurioita aiheuttaa vasta pakkanen. Monivuotisille kasveille on elintärkeää kestää myös alle 0 °C lämpötiloja alueilla, joilla lämpötila laskee talvisin näin alas. Kasveille kylmästä tai jäätymisestä aiheutuvien vaurioiden vakavuus riippuu useista tekijöistä, kuten karaistumisen asteesta, kasvin kehitysvaiheesta, lämpötilamuutosten nopeudesta ja muista stressitekijöistä, kuten kuivuudesta tai hapenpuutteesta (Calder ym. 1965, Paquin ja Mehuys 1980, Sakai ja Larcher 1987, Bertrand ym. 2001).

2.2.1 Jäätyminen

Kasvisolukossa jäätyminen voi tapahtua joko solun sisällä, tai sen ulkopuolella (Sakai ja Larcher 1987). Jäätyminen alkaa yleensä jäätymisytimistä, joka on hiukkanen, jonka pinnalle jäätä alkaa muodostua. Mikäli jäätymisytimiä ei ole, voi puhdas vesi alijäähtyä koeoloissa lähes -40 °C lämpötilaan. Sen jälkeen vesimolekyylien liikkeen hidastumisen seurauksena ne alkavat muodostaa ryhmiä, jotka toimivat jäätymisytiminä aikaansaaden spontaanin, homogeenisen jäätymisen. Kasvisoluissa vesi ei ole puhdasta, vaan siihen liuenneet aineet alentavat jäätymispistettä ja mahdollistavat veden alijäähtymisen jopa -41 - -47 °C:een, ennen kuin spontaania homogeenistä jäätymistä tapahtuu. Mikäli nesteen joukossa on ulkopuolisia jäätymisytimiä, alkaa jäätyminen huomattavasti lämpimämmässä näiden ympärille; tätä sanotaan heterogeeniseksi jäätymiseksi. Jäätymisytimiä voivat olla kasvin omat osat esimerkiksi lehdissä, tai ulkopuoliset kohteet, kuten bakteerit ja pöly.

Luonnon olosuhteissa solunsisäinen jäätyminen tappaa yleensä kasvisolut (Sakai ja Larcher 1987). Solujen kuolema johtuu siitä, että kasvaessaan jääkiteet rikkovat

solukalvoja. Kun kalvot rikkoutuvat, kasvin aineenvaihdunta ei enää toimi kunnolla. Solut voivat kuitenkin selvitä hyvin nopeasta jäätymisestä ja sulamisesta, jolloin jääkiteet jäävät pieniksi ja toisaalta sulavat ennen kuin ne kasvavat riittävän suuriksi rikkoakseen solukalvon. Tämä on kuitenkin mahdollista vain laboratorio-oloissa, ei luonnossa.

Solun ulkopuolinen jäätyminen tapahtuu solukalvon ja soluseinän välisessä tilassa (Sakai ja Larcher 1987). Tämä väli on kasveissa yleensä ilman täyttämä, joten jäätymisytimet muodostuvat solujen pinnalla oleviin vesikalvoihin tai –pisaroihin. Koska jääkiteeseen sitoutuu puhdasta vettä, ympärillä oleva vielä jäätyvätön liuos väkevöityy. Tämän seurauksena myös solun sisäpuolelta alkaa diffundoitua vettä solukalvon läpi ja solun alkaa kuivua. Samalla solun sisältö väkevöityy, mikä parantaa sen jäätyksen kestoa ja osaltaan mahdollistaa alijäähtymisen. Jos lämpötila laskee nopeasti, voi kuitenkin käydä niin, ettei vesi ehdi diffundoitua riittävän nopeasti ulos solusta, jolloin sisältö ei ehdi väkevöityä tarpeeksi estääkseen solunsisäistä jäätymistä. Tämän seurauksena solu yleensä kuolee.

2.2.2 Jäätyksen aiheuttamat vauriot

Pakkanen ja sen seurauksena tapahtuva jäätyminen aiheuttaa eri asteisia vaurioita kasvisolussa erilaisin mekanismein (Sakai ja Larcher 1987). Jäätysherkkien ja karaistumattomien kasvisolujen ja –solukoiden nopea jäätyminen rikkoo solukalvot ja aiheuttaa solujen kuoleman. Tämä tapahtuu jo muutamassa pakkasasteessa heterogeenisen jäätyksen seurauksena. Kuitenkin sama voi tapahtua myös kylmää kestävässä alijäähtynyttä liuosta sisältävissä soluissa, jos lämpötila laskee niin alas, että spontaani homogeeninen jäänmuodostus alkaa.

Kylmää kestävässä soluissa ja solukoissa jäätyminen alkaa solunulkoisena (Sakai ja Larcher 1987). Koska solun ulkopuolella sula vesi vähenee, diffuusio siirtää solukalvon läpi lisää vettä solukalvon ulkopuolelle. Näin solun sisällä liuoksen väkevyys kasvaa, mikä suojaa solua jäätymiseltä. Mikäli vettä kuitenkin siirtyy solun ulkopuolelle liikaa, voi kuivuminen vaurioittaa solua, tai kuivumisen asteesta riippuen jopa tappaa sen.

2.2.3 Karaistuminen

Viileiden ja kylmien talvien alueilla kasvien on karaistuttava syksyllä selvitäkseen talven yli (Sakai ja Larcher 1987). Kuten monet muutkin kasvit, sinimailanen ei kasvukaudella karaistumattomana selviä kuin muutaman asteen pakkasesta, mutta karaistumisen jälkeen pohjoisiin oloihin sopivat lajikkeet voivat kestää jopa alle -20 °C lämpötiloja (McKenzie ym. 1988).

Kasvilajista riippuen karaistumisen alkamisen saa aikaan joko lyhenevä päivänpituus, alhainen lämpötila tai nämä molemmat yhdessä (Sakai ja Larcher 1987). Bula ym. (1956) havaitsivat että pohjoista alkuperää olevalla sinimailaslajikkeella 'Ranger' ja sirppimailasella lämpötilan laskiessa karaistuminen onnistui jo 12 tunnin päivänpituudessa, kun eteläisemmällä sinimailaslajikkeella 'Arizona Common' karaistuminen alkoi vasta päivän lyhennyttyä 10-tuntiseksi. Hodgson (1964) taas havaitsi, että Alaskan Palmerin liian pitkässä päivässä elokuun puolivälistä eteenpäin 'Ranger' karaistui huomattavasti nopeammin, kuin sen alkuperäisalueen lokakuun alusta lyhenevää päivää vastaavassa päivänpituudessa. Päivänpituuden vaikutus karaistumiseen riippuu siis lajikkeesta ja leveysasteesta jolle se on alkujaan jalostettu ja Hodgson (1964) piti päivänpituusvastetta jopa yhtä tärkeänä karaistumiseen vaikuttavana tekijänä kuin lämpötilaa.

Kasvit karaistuvat kahdessa vaiheessa; ensimmäinen vaihe alkaa lämpötilan ollessa 10 – 20 °C ja toinen vaihe lämpötilan laskiessa alle 5 °C (Sakai ja Larcher 1987). Toisaalta Levittin (1980) ja Eaglesin ym. (1997) mukaan karaistuminen alkaa vasta noin alle 10 °C lämpötiloissa, ja on tehokkaimmillaan 0 - +5 °C lämpötiloissa. Karaistuminen ei kuitenkaan saavuta huippuaan vielä näissäkään lämpötiloissa, vaan suurimman mahdollisen karaistumisen saavuttamiseksi tarvitaan lämpötiloja, jotka ovat hieman alle 0 °C (Levitt 1980). Castonguay ym. (1993) havaitsivat, että kaksi viikkoa +2 °C:ssa karaistuneilla sinimailasilla kylmänkesto oli parempi, kuin sellaisilla, joiden karaistumista samassa lämpötilassa jatkettiin vielä toiset kaksi viikkoa. Sen sijaan sinimailaset, joiden kahden viikon jatkokaraistumiskäsittely tehtiin -2 °C:ssa, kestivät kylmää lajikkeesta riippuen yhtä hyvin tai paremmin kuin ennen jatkokäsittelyä. Kaksivaiheisen prosessin sijaan kyseessä on ennemminkin jatkuva tapahtumasarja, jossa yhä kylmenevät lämpötilat saavat karaistumisen syvenemään.

Myös kosteusolot vaikuttavat karaistumiseen ja kylmänkestoon. Calder ym. (1965) havaitsivat, että kenttäkapasiteetissa (jossa maassa on niin paljon vettä, kuin se pystyy pidättämään huokosiinsa) ja 25 % kenttäkapasiteetista olevassa maassa karaistuneet sinimailaset saavuttivat paremman kylmänkeston, kuin veden kyllästämässä maassa karaistuneet sinimailaset. Paquin ja Mehuys (1980) puolestaan havaitsivat 30 % suhteellisessa maan kosteudessa kasvatettujen rehumailasten LT50- arvojen olevan 4-7 °C alempia, kuin veden kyllästämässä maassa kasvaneilla rehumailasilla.

Kasvin karaistuessa varastohiilihydraattina toimiva tärkkelys alkaa hajota liukoiksi sokereiksi, jolloin sokeripitoisuus eri kasvinosissa nousee (Levitt 1980). Mikäli fotosynteesi vielä jatkuu karaistumisolosuhteissa se voi myös kerryttää varastosokereita kasviin karaistumisen alkaessa ja kasvun loppuessa (Levitt 1980). Vaikka jäätymisenkesto ei suoraan johdukaan suurentuneesta liukoisten sokereiden pitoisuudesta, on kuitenkin näiden kahden välillä selvä yhteys (Eagles ym. 1997). Saman kasvilajin, esimerkiksi vehnän (*Triticum aestivum* L.), kylmänkesto ja karaistumisen astetta voidaan joissakin tapauksissa ennustaa sokeripitoisuudesta melko hyvin, jos vertailtavien lajikkeiden alkuperä on samalla alueella, mutta eri kasvilajien tai eri alueelta peräisin olevien kantojen vertailu ei yleensä onnistu (Levitt 1956, 1980).

Sokereiden lisäksi soluihin kertyy niiden karaistuessa myös muita yhdisteitä, esimerkiksi proteiineja. Trunova (1982) havaitsi syysvehnällä, että jos proteiinisynteesi estetään, karaistumista ei tapahdu, vaikka soluihin kertyy sokereita, vaan karaistumiskäsittelyn saaneet kasvit eivät kestä kylmää käsittelemättömiä enempää. Haagenonin ym. (2003) tutkimuksessa karaistuneiden sinimailasten juurissa proteiineja oli enemmän kuin karaistumattomilla kasveilla ja lisäksi kylmänkestävimmät lajikkeet kerryttivät niitä kylmänarkoja lajikkeita enemmän. Soluun syntetisoituvat proteiinit voivat toimia entsyymeinä alle 0 °C lämpötiloissa, suojata solun sisältöä jäätymiseltä ja muuttaa solukalvon ominaisuuksia kestävämmän solun ulkopuolisen jäätymisen aiheuttamaa stressiä solulle (Trunova 1987). Karaistumisen yhteydessä proteiinipitoisuuden kasvamisen lisäksi myös RNA:n synteesi lisääntyy ja solun RNA:n määrä voi kasvaa jopa kaksinkertaiseksi lähtötilanteeseen verrattuna. (Trunova 1987). Proteiinien lisäksi myös vapaita aminohappoja kertyy kasvisoluihin karaistumisen aikana (Sakai ja Larcher 1987, Castonguay ym. 2011).

2.2.4 Karaistumisen ja kylmänkeston tutkiminen

Kasvien kylmänkestoa voidaan tutkia suoraan ja epäsuoraan menetelmin. Suora menetelmä on esimerkiksi kokonaisten kasvien käsittely eri kylmätestilämpötiloissa, jonka jälkeen ne istutetaan kasvualustaan ja tutkitaan, kuinka suuri osa kasveista lähtee kasvamaan ja kuinka moni on kuollut (Gusta ym. 2003). Tätä menetelmää käyttivät esimerkiksi Korhonen (2014) ja Toivonen (2014). Kylmäkäsittelyssä on tärkeää, ettei lämpötilaa lasketa liian nopeasti, vaan korkeintaan 1-2 °C tunnissa, jotta lämpötilan laskunopeus vastaisi luonnossa tapahtuvaa ja tulokset olisivat luotettavia (Palta 1989). Sama koskee myös lämpötilan nousunopeutta, kun kasvinäytteitä sulatetaan (Palta 1989). Kylmänkestävyysarvoksi määritetään LT_x (lethal temperature), joka tarkoittaa lämpötilaa, jossa x % kasveista kuolee. Useimmiten kylmänkeston rajana käytetään sitä että 50 % kasveista kuolee eli määritetään LT_{50} , mutta myös muunlaisia kylmänkestävyysarvoja, kuten LT_{90} voidaan määrittää. Onkin aina syytä tietää, mitä kylmänkestolla tarkalleen tarkoitetaan.

Epäsuorasti kylmänkestoa voidaan tutkia ionivuotomenetelmällä. Esimerkiksi Dexter ym. (1932) vertailivat sinimailas- ja muiden kasvilajikkeiden karaistumista ja kylmänkestoa jäädyttämällä juuria ja liuottamalla niitä tislatussa vedessä, jonka jälkeen mitattiin liuoksen sähkönjohtavuus. Näin saatiin eri lajikkeet keskenään vertailukelpoiseen järjestykseen. Sähkönjohtavuuden lisääntyminen johtuu solukalvojen rikkoutumisesta ja soluista ulos vuotavista elektrolyyteistä. Myöhemmin menetelmää on kehitetty mittaamalla sähkönjohtavuus ensin kylmäkäsittelyn jälkeen ja sitten tuhoamalla kaikki solukalvot esimerkiksi autoklaavissa tai keittämällä, jonka jälkeen mitataan sähkönjohtavuus uudestaan. Näin saadaan laskettua, kuinka suuri osa elektrolyyteistä on vapautunut kylmäkäsittelyssä. Käyttämällä useita testilämpötiloja on voitu määrittää LT_{50} -arvoja sekä lehdistä (mm. Thapa ym. 2008, Zhao ym. 2014), että juurista (mm. Bula ja Smith 1954, Hodgson 1964). LT_{50} -arvona ionivuotomenetelmässä pidetään testilämpötilaa, jossa 50 % elektrolyyteistä on vuotanut ulos tutkitusta näytteestä, eli sähkönjohtavuus kylmäkäsittelyn jälkeen on 50 % sähkönjohtavuudesta solukalvojen tuhoamisen jälkeen.

Karaistumisen syvyyttä voidaan puolestaan tutkia esimerkiksi karaisemalla kasveja erilaisilla viileä- tai kylmäkäsittelyillä ja määrittämällä sen jälkeen niiden

kylmänkestävyys. Lisäksi voidaan määrittää mitä erilaisia yhdisteitä soluihin kertyy ja kuinka paljon. Kasvin eri osien välillä voi olla eroja karaistumisen syvyydessä, esimerkiksi lituruohon (*Arabidopsis thaliana* L.) nuoret lehdet saavuttavat samassa käsittelyssä syvemmän karaistumisen kuin vanhat (Wanner ja Junttila 1999). Siksi onkin tärkeää, että mittaukset tehdään aina samoista kasvinosista, jotka ovat keskenään samassa kehitysvaiheessa.

2.2.5 Sinimailasen syysdormanssi ja talvenkesto

Sinimailaslajikkeiden talvenkestoa on pitkään arvioitu syysdormanssiksi (fall dormancy) kutsutun ominaisuuden perusteella. Syysdormanssin voimakkuudella tarkoitetaan kasvun loppumisen ajankohtaa syksyllä; useimmiten aikaisin kasvunsa lopettavat lajikkeet ovat myös talvenkestävimpiä (McKenzie ym. 1988). Syysdormanssin kehittymiseen vaikuttavat lyhenevä päivänpituus ja viileät lämpötilat, eli samat tekijät, jotka saavat myös karaistumisen aikaan (McKenzie ym. 1988). Lajikkeille voidaan määrittää dormanssiluokka, joka määräytyy syksyn viimeisen niiton (yleensä syyskuun alussa, riippuu paikkakunnasta, jolla määritys tehdään) jälkeen tapahtuvan jälkikasvun perusteella yleensä lokakuun alussa (Teuber ym. 1998). Jos jälkikasvu on 0-5 cm, lajike saa luokan 1, jos se on 5-10 cm, lajike saa luokan 2 ja niin edelleen 5 cm:n välein (Teuber ym. 1998). Koska jälkikasvu riippuu paikkakunnan ilmastosta, päivänpituudesta ym. tekijöistä, on myös määritetty vertailulajikkeet dormanssiluokille 1-11 (Teuber ym. 1998). Luokkien 1-3 lajikkeita pidetään dormantteina (dormant), luokkien 4-6 lajikkeita melko dormantteina (semidormant) ja luokan 7 ja suurempien luokkien lajikkeita vähän tai ei ollenkaan dormantteina (nondormant) (Wang ym. 2009). Dormantit lajikkeet ovat kasvutavaltaan kohenevia ja melko rentoja, kun taas heikommen dormanssin lajikkeet ovat pystyjä ja jämeriä (Teuber ym. 1998).

Voimakkaan syysdormanssin sinimailaslajikkeiden sato on yleensä matalampi, kuin vähemmän dormantteilla lajikkeilla, sillä niiden syksyn viimeinen sato jää pieneksi ja kasvu alkaa keväällä myöhemmin. Siksi onkin pyritty löytämään talvenkestäviä lajikkeita, jotka eivät olisi kovin voimakasdormanssisia. Brummer ym. (2000) havaitsivat, että on mahdollista jalostaa lajikkeisiin samaan aikaan sekä parempaa

talvenkestoa, että voimakkaampaa syyskasvua. Brouwer ym. (2000) puolestaan löysivät lajikkeita, joiden talvenkesto oli parempi, kuin dormanssiluokan perusteella olisi voinut ennustaa. Lisäksi he löysivät sinimailaslajikkeesta Blazer XL 17 useita geenimerkkejä, joiden avulla alhaisen syysdormanssin sinimailaslajikkeisiin voisi saada risteytettyä talvenkestävyyttä parantavia geenialleeleita. Weishaar ym. (2005) onnistuivat valintajalostuksella parantamaan neljän eri ei-dormantin lajikkeen talvenkestoa. Kolmen valintakierroksen jälkeen kasvien talvenkestävyys oli parantunut ja syyskasvu madaltunut, mutta tämä ei kuitenkaan alentanut kokonaissatoa. Vaikka voimakkaalla syysdormanssilla onkin yleensä yhteys hyvään kylmän- ja talvenkeston, on se siis saavutettavissa myös vähemmän dormantteihin lajikkeisiin, eikä sitä enää pitäisi käyttää valintaperusteena kylmänkestoa jalostettaessa.

3 Tutkimuksen tavoitteet

Tutkimuksen tavoitteena oli selvittää kuuden eri sinimailaslajikkeen välisiä eroavuuksia niiden karaistumisnopeudessa ja kylmänkestävyydessä. Tavoitteena oli myös selvittää johtuvatko mahdolliset erot lajikkeiden välillä versojen ja juurten erilaisista sokeri- ja tärkkelyspitoisuuksista. Lisäksi haluttiin selvittää löytyykö koejäsenien joukosta kylmänkestävyydeltään mahdollisesti Suomen olosuhteissa peltoviljelyyn sopivia lajikkeita.

Tutkimushypoteesin mukaan kasvien karaiseminen ennen kylmäkäsittelyä parantaisi niiden kylmänkestoa, eri lajikkeilla eri tavoin. Hypoteesin mukaan dormantin tyyppin lajikkeiden kylmänkesto olisi eteläisiä parempi ja karaistuminen voimakkaampaa.

4 Aineisto ja menetelmät

4.1 Käytetty kasvimateriaali ja koejärjestelyt

4.1.1 Peltokoe

Peltokokeen kasviaineistona oli neljä sinimailaslajiketta; Alexis (Boreal), Nexus (Lantmännen), Live (Graminor) ja Lavo (Graminor). Jokaisesta lajikkeesta oli neljä kerrannetta. Koe perustettiin Luonnonvarakeskuksen (LUKE) Ylistaron toimipaikkaan

(62,95° N, 22,53° E) kesällä 2014 ilman suojaviljaa. Kylvötiheys oli 700 siementä/m² ja perustamisen yhteydessä annettiin NPK-lannoitteena (YaraMila Pellon Y1, Yara Suomi oy, Suomi) 30 kg typpeä, 3 kg fosforia ja 3 kg kaliumia hehtaarille. Koeruutujen maalaji oli multava hieno hieta ja maan pH 6,3.

Peltokokeen kasveista otettiin sekä tuoreet näytteet kokonaisina kasveina kylmätestiä varten, että kuivattavat näytteet versot ja juuret erikseen liukoisten sokerien ja tärkkelyspitoisuuden määrittystä varten. Näytteitä otettiin noin kahden kuukauden välein, yhteensä neljä kertaa talvikauden 2014-2015 aikana (13.10.2014, 18.12.2014, 9.2.2015 ja 7.4.2015). Yhdellä näytteenottokerralla jokaisesta kerranteesta otettiin tuoreiksi näytteiksi 20-25 kasvia ja kuivattaviksi näytteiksi 10 kasvia. Tuoreet näytteet toimitettiin kylmälaukussa kosteaan käsipyyhepaperiin ja sanomalehteen kiedottuina ja muovipusseihin pakattuna Matkahuollon kautta Ylistarosta Viikkiin, jolloin ne olivat näytteenottoa seuraavana päivänä perillä. Kuivattavat näytteet punnittiin Ylistarossa ensin tuoreina ja uudelleen kuivattuina (20 h, 70 ° C) kuiva-ainepitoisuuden määrittystä varten, minkä jälkeen ne lähetettiin Viikkiin. Viikissä kuivat näytteet jauhettiin kasvianalyysimyllyllä (Retsch ZM200, Retsch GmbH, 42781 Haan, Germany) 0,5 mm seulalla juurten liukoisten sokerien ja tärkkelyspitoisuuden määrittystä varten. Jauhetut näytteet säilytettiin suljettavissa muovipusseissa huoneenlämmössä valolta suojattuna määrityksien tekoon saakka.

4.1.2 Kasvatuskaappikoe

Kasvatuskaappikokeessa kasviaineistona oli peltokokeessa käytettyjen lajikkeiden (Alexis, Nexus, Live, Lavo) lisäksi lajikkeet Hunter River (Australia) ja Rangelander (Kanada). Jokaista lajiketta kylvettiin 20 astiaan, eli kaikkiaan 120 astiaa. Koe perustettiin 7.11.2014 Helsingin yliopiston kasvihuoneelle Viikissä. Kasvihuoneella päivän pituus oli säädetty suurpainenatriumlampuilla 16 tuntiin, päivälämpötila oli 20 °C ja yölämpötila 16 °C. Valon intensiteetti kasvihuoneella oli 200 µmol/s. Sinimailasen siemenet kylvettiin 2,0 litran vetoisiin astioihin hiekka-kasvuturveseokseen (1/3 kvartsihiekkaa, 2/3 lannoitettua ja kalkittua vaaleaa turvetta (Kekkilä White 420 W)). Ennen kylvöä kasvualusta kasteltiin kevyesti ja siementen joukkoon sekoitettiin typensitojabakteeriympästä (*Sinorhizobium meliloti*, Elomestari

oy, Suomi). Joka astiaan kylvettiin noin 1,5 cm syvyyteen vähintään 14 siementä riittävän taimimäärän varmistamiseksi. Typensitojabakteeriympästä ripoteltiin vielä astian pinnalle. Kylvön jälkeen kasvualustat kasteltiin uudelleen kevyesti.

Kylvön jälkeen astioita kasteltiin silmämääräisesti havaitun tarpeen mukaan, ennen taimettumista ja taimien ollessa pieniä kevyesti sumupullolla ja laskemalla kasvihuoneen pöydälle vettä, myöhemmin vesiletkulla ja tulvittamalla pöytää. Astioiden järjestys satunnaisettiin kerran viikossa reunavaikutusten välttämiseksi. Kymmenen päivää kylvön jälkeen esiharvennettiin taimet tiheyteen 8 kasvia/astia ja 18 päivän kuluttua kylvöstä harvennettiin taimet lopulliseen tiheYTEensä 6 kasvia/astia.

Käsittelyjä oli kolme; kontrolli samoissa kasvihuoneolosuhteissa kuin taimien alkukasvatus (A) ja kaksi karaistumiskäsittelyä (B ja C) kasvatuskaapeissa (Weiss Technik, Germany) (taulukko 1). Valon intensiteetti kasvatuskaapeissa oli noin 50 $\mu\text{mol/s}$. Käsittelyt aloitettiin joko 45 tai 47 vrk kuluttua kylvöstä (taulukko 1) ja ne kestivät 21 vrk, paitsi kontrolli josta näytteet kerättiin 28 vrk käsittelyjen aloituksesta. Joka käsittelyssä lajiketta kohden oli 3 kerrannetta. Yksi kerranne käsitti kaksi astiaa eli 12 kasvia, tällä varmistettiin riittävä määrä kasvimateriaalia analyysijä varten. Käsittelyjen päätyttyä lehdet ja juuret kerättiin tyhjentämällä astiat, poistamalla enimmäkseen juuristosta käsin ja pesemällä juuret runsaalla kylmällä vedellä. Näistä kahdeksan kasvia käytettiin kylmätestiin ja loput neljä punnittiin juuret ja versot erikseen tuoreena, kuivattiin 60 °C lämpötilassa 2 vrk ja punnittiin uudelleen kuiva-ainepitoisuuden määrittämiseksi. Lisäksi käsittelyjen aloituksen yhteydessä (45 vrk kylvöstä) jäi yli 2 astiaa joka lajikkeesta. Niistä kerättiin näytteet kuivattaviksi (ei käsittelyä = D) samalla tavalla kuin karaistumis- ja kontrollikäsittelyistä (taulukko 1). Kumpikin astia oli oma kerranteensa. Kaikki kuivatut kasvit jauhettiin myöhemmin kasvianalyysimyllyllä (Retch) 0,5 mm seulalla analyysijä varten.

Taulukko 1. Eri käsittelyjen aloitus- ja lopetusajat kasvatuskaappikokeessa

Käsittely	Aloitusaika vrk kylvöstä	1-2. viikko lämpötila päivällä/yöllä	3. viikko lämpötila päivällä/yöllä	Näytteiden keräys vrk kylvöstä
A	45	20° C / 16° C	20° C / 16° C	73
B	45	7° C / 3° C	7° C / 3° C	66
C	47	7° C / 3° C	5° C / -2° C	68
D	45			45

4.2 Kokeiden aikana tehdyt havainnot

4.2.1 Peltokoe; säähavainnot ja talvituhot

Peltokokeen säätiedot saatiin Ilmatieteen laitoksen avoimen datan palvelusta, Seinäjoen Pelmaan sääaseman (62,94° N, 22,49° E, noin 4 km päässä koealasta) keräämästä aineistosta ajalta 1.8.2014 - 30.4.2015. Aineistoon kuuluivat vuorokauden keskilämpötila, sademäärä, lumipeitteen syvyys sekä ylin ja alin lämpötila. Aineistosta määritettiin karaistumiskauden alku- ja loppumispäivät, karaistumiskauden aikana kertyneet astepäivien lukumäärä ja summa 0 - 5 °C välillä, sekä karaistumisastepäivien nettokertymä Bélangerin ym. (2002) talvehtimismallin mukaisesti (taulukko 2). Kyseinen talvehtimismalli sisältää muitakin talvehtimiseen liittyviä muuttujia, mutta tässä tutkimuksessa laskettiin ainoastaan karaistumiseen liittyviä tekijöitä.

Kasvuston tiheys määritettiin sekä ennen talvea, että keväällä kasvun alettua. Havainnointi tapahtui silmämääräisesti arvioimalla kasvuston tiheys prosentteina täystiheestä. Vertaamalla syksyn tiheyttä kevään tiheyteen saatiin arvio tapahtuneista talvituhoista.

Taulukko 2. Sääaineistosta lasketut karaistumisjaksoa kuvaavat muuttujat Bélangerin (2002) talvehtimismallin mukaan. Lumipeitettä ei huomioitu karaistumisjakson määrittämisessä.

Muuttuja	Kuvaus
A Karaistumisen alkupäivä	Vuorokauden keskilämpötila ensimmäisen kerran $\leq +5$ °C
B Karaistumisen loppumispäivä	Vuorokauden keskilämpötila ensimmäisen kerran ≤ -10 °C
C Karaistumisjakson pituus	Päivien lukumäärä A:sta B:hen
D Astepäivät 5 °C yläpuolella	Astepäivien summa A:sta B:tä edeltävään päivään, kun vrk keskilämpötila > 5 °C
E Astepäivät 5 °C alapuolella	Astepäivien summa A:sta B:tä edeltävään päivään, kun vrk keskilämpötila < 5 °C
F Karaistumisen nettokertymä	E-D
G Kasvukauden päättymispäivä	Ensimmäinen päivä, josta alkaen vrk keskilämpötila pysyvästi $\leq +5$ °C

4.2.2 Kasvatuskaappikokeen aikana tehdyt havainnot

Karaistumiskäsittelyjen aikana kasvien kasvua seurattiin mittaamalla niistä pääversion korkeus ja solmuvälien lukumäärä noin viikon välein. Joka astiasta valittiin satunnaisesti kaksi kasviyksilöä, jotka merkittiin kumilangalla. Ensimmäinen mittausta tehtiin käsittelyjen aloituspäivänä, paitsi käsittelylle B vasta viikon kuluttua. Mittaustuloksista laskettiin solmuvälien määrän ja kasvien korkeuden lisäys karaistumiskäsittelyjen aikana.

4.3 Kylmänkestävyyden mittaaminen

4.3.1 Peltokoe

Lajikkeiden välisiä kylmänkestävyyden eroja verrattiin ionivuotokokeen avulla. Ionivuotokoea käytettiin, sillä sinimailasen juurten kerääminen näytteeksi riittävän ehjinä jälleenkasvutestiä varten on aiemmin todettu hankalaksi. (Mervi Seppänen, henkilökohtainen tiedonanto 20.12.2016).

Kylmätesti aloitettiin välittömästi näytteiden saavuttua Viikkiin. Testi tehtiin ainoastaan kasvien juurille, ei lehdille. Testissä käytettiin viittä eri testilämpötilaa sekä kontrollia, joka säilytettiin kylmätestin ajan jääkaapissa +4 °C:ssa kylmätestin ajan (taulukko 3). Kylmätestissä käytetyt lämpötilat arvioitiin kirjallisuuden perusteella, mutta lokakuun kylmätestin jälkeen lämpötiloja päädyttiin alentamaan, sillä sinimailasen juurten ionivuoto osoittautui alhaiseksi myös alimmassa testilämpötilassa (taulukko 3). Testausta varten pääjuuresta leikattiin partaterällä noin 2 cm pitkä pala aivan kruunun alapuolelta. Juuren pala laitettiin lasiseen koeputkeen, jonka pohjalle oli ensin lisätty 1 ml:lla mQ-vettä kostutettu linssinpuhdistuspaperin palanen suojaamaan juurta suoralta kosketukselta lasiin ja varmistamaan jäätymisen alkamisen solujen ulkopuolelta. Jokaisen kerranteen kolmesta kasvista laitettiin näytteet yhteen koeputkeen yhtä testilämpötilaa kohden. Näiden kolmen juuren palan keskiarvoa käytettiin kerranteen arvona.

Taulukko 3. Peltokokeen kylmätesteissä käytetyt testilämpötilat eri kuukausien näytteenotoissa.

Testilämpötila °C	+4	-6	-8	-10	-12	-14	-16	-18
Lokakuu	x	x	x	x	x	x		
Joulu-, helmi- ja huhtikuu	x			x	x	x	x	x

Näytteiden lisäämisen jälkeen putket laitettiin kylmähauteeseen (Lauda proline RP 3530), joka oli esijäähdytetty -2 °C lämpötilaan. Kontrolliputkia säilytettiin jääkaapissa +4 °C:ssa kylmätestin ajan. Heti hauteeseen siirron jälkeen putkiin lisättiin pieni jääkide jäätymisytimeksi. Näytteet olivat hauteessa yön yli -2 °C:ssa jonka jälkeen lämpötilaa laskettiin 2 °C/h. Kun ensimmäinen haluttu testilämpötila oli saavutettu, otettiin kyseisen lämpötilan näytteet pois hauteesta ja vietiin jääkaappiin +4 °C:seen sulamaan. Tämän jälkeen näytteitä poistettiin tunnin välein hauteesta, kunnes viimeinen testilämpötila oli saavutettu.

Seuraavana aamuna näytteet siirrettiin numeroituihin 20 ml vetoisiin muovipulloihin, joihin oli laitettu 15 ml mQ-vettä. Jokainen juuren pala laitettiin omaan pulloonsa. Pullot laitettiin koeputkitelineisiin ja koeputkitelineissä ravistimeen (RotoShake Genie model no. SI-1102, Scientific industries INC, Bohemia, N.Y. 11716, USA) yhden tunnin ajaksi. Ravistettujen näytteiden sähkönjohtavuus mitattiin johtokykymittarilla (Jenway 4020 conductivity meter, Felsted, Gt. Dunmow, Essex, UK). Jokaisen mittauksen välillä anturi huuhdottiin huolellisesti runsaalla mQ-vedellä.

Sähkönjohtavuuden mittauksen jälkeen näytteet laitettiin 100 °C vesihauteeseen 30 min ajaksi. Tämän jälkeen ne vietiin yöksi kylmiöön. Aamulla näytteitä ravisteltiin 1 h, jonka jälkeen niiden sähkönjohtavuus mitattiin uudelleen. Eri kylmäkäsittelyjen aiheuttama ionivuoto laskettiin kaavalla:

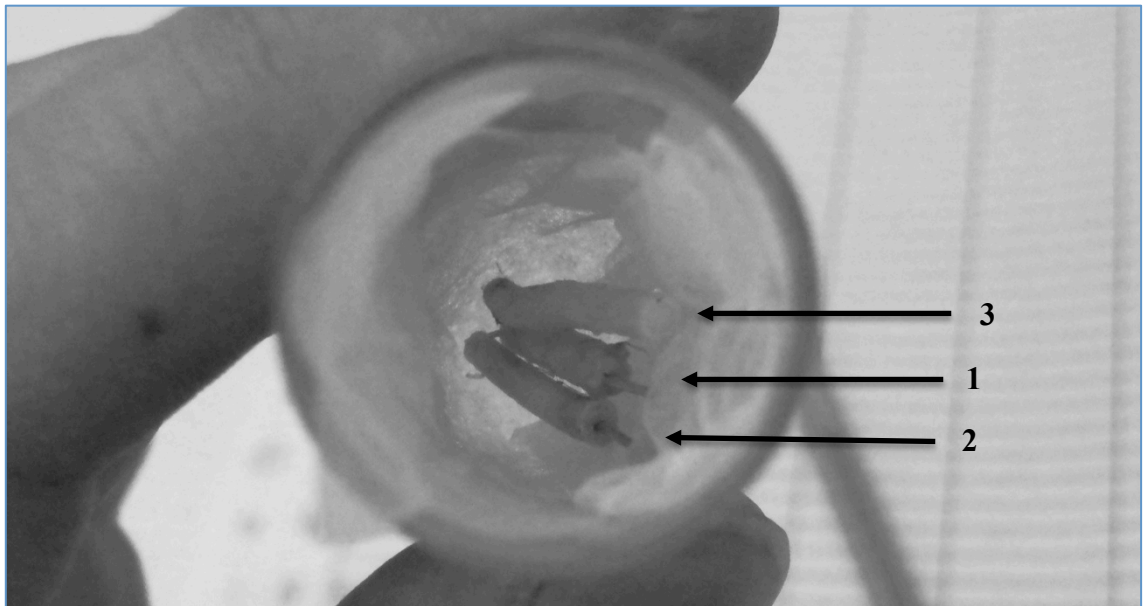
$$\text{ionivuoto \%} = \frac{\text{sähkönjohtavuus ennen keittoa}}{\text{sähkönjohtavuus keiton jälkeen}} \times 100\%$$

4.3.2 Kasvatuskaappikoe

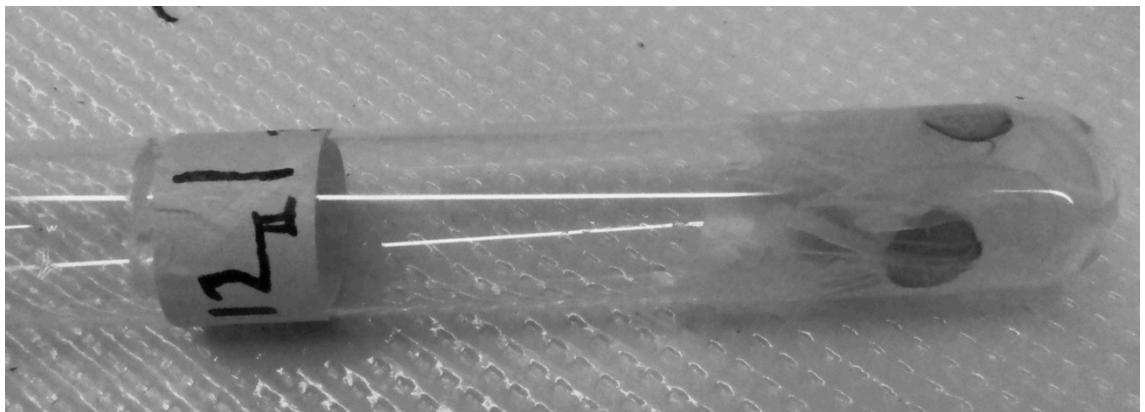
Kylmätestissä käytettiin samaa ionivuotomenetelmää kuin peltokokeessa, mutta korkeammilla testilämpötiloilla (-4, -6, -8, -10, -12, -14, -16 ja kontrolli +4 ° C). Testi tehtiin juurien lisäksi halkaisijaltaan 10 mm lehtikiekoille. Kylmätestit tehtiin yhdelle karaistumiskäsittelylle kerrallaan, aloittaen käsittelystä B ja lopettaen kontrollikäsittelyyn A (taulukko 1), koska laitteisto ei mahdollistanut kaikkien näytteiden käsittelyä kerralla.

Kylmätestiä varten juurista leikattiin 2-3 cm kappale kruunun alapuolelta, kuten peltokokeessakin. Kasvimateriaalin rajallisen määrän vuoksi joka kerranteesta oli testilämpötilaa ja lajiketta kohden yksi juuren pala ja ne kaikki laitettiin samaan koeputkeen mQ-vedellä kostutetulle linssipaperille. Kerranteet 1 ja 2 merkittiin työntämällä niihin eri väriset koruneulat ja kerranne 3 jäi ilman neulaa (kuva 1). Siihenkin kuitenkin työnnettiin neulalla reikä, jotta käsittelyt olisivat yhtenevät.

Lehdistä leikattiin lehtiporalla kylmätestiin halkaisijaltaan 1 cm lehtikiekot (1 kpl/kerranne/testilämpötila/lajike kuten juuristakin). Kiekot leikattiin kasvin nuorimmista täysikokoisiksi kasvaneista lehdistä. Kiekot aseteltiin putkien seinämille jossa ne liimautuivat kostutettuun linssipaperiin. Putkeen merkittiin kerranteet roomalaisin numeroin (kuva 2). Tämän jälkeen kylmätesti suoritettiin sekä lehdille että juurille kuten peltokokeessa. Kun juuret siirrettiin kylmäkäsittelyn jälkeen ionivuotoputkiin, niistä poistettiin merkkeinä toimineet neulat.



Kuva 1. Juurten eri kerranteet merkittiin eri värisillä koruneuloilla. Kulta = kerranne 1, hopea = kerranne 2, ei neulaa = kerranne 3.



Kuva 2. Lehtikiekkojen kerranteet aseteltiin eri puolille koeputkea ja merkittiin roomalaisin numeroin koeputken numeron viereen. Kuvassa putki numero 12 ja etualalla kerranne 2.

4.4 Liukoisten sokerien pitoisuuden määrittäminen

Sekä pelto- että kasvatuskaappikokeessa liukoisten sokerien pitoisuudet mitattiin kuivatuista ja jauhetuista näytteistä anthron-menetelmällä (Yemm ja Willis 1954). Peltokokeessa yhden kuukauden näytteet analysoitiin aina kerrallaan. Joulukuussa ja huhtikuussa määritettiin sokeripitoisuudet vain juurista, lokakuussa myös maanpäällisistä kasvinosista, jolloin juurien ja versojen näytteet analysoitiin eri

kerroilla. Kasvatускаappikokeessa analyysi tehtiin yhdelle kasvinosalle (versot/juuret) ja yhdelle kerranteelle kerrallaan.

Jauhettua näytettä punnittiin $30 (\pm 3 \text{ mg})$ 50 ml vetoisiin muovisiin sentrifugiputkiin. Putkiin lisättiin 30 ml 77 til.-%:sta etanolia, jonka jälkeen ne sekoitettiin koeputkiravistimella (Vortex G-560E, Scientific industries INC, Bohemia, N.Y. 11716, USA). Sokerit uutettiin etanoliin pitämällä näytteitä 60 minuuttia 80°C vesihauteessa 150 rpm ravistuksessa. Sekoittumisen tehostamiseksi uuton aikana putket sekoitettiin kolme kertaa koeputkiravistimella (20, 40 ja 60 minuutin kuluttua uuton aloituksesta). Uuton jälkeen näytteet saivat jäähtyä kymmenen minuuttia vesi-jää-hauteessa. Tämän jälkeen ne sentrifugoitiin 5 minuuttia 4700 rpm kierrosnopeudella $+4^\circ\text{C}$:ssa. Supernatantti kaadettiin samanlaiseen puhtaaseen putkeen varoen, jotta pohjalla oleva pelletti säilyisi ehjänä ja kiintoainesta ei joutuisi näytteeseen mukaan. Kaikki näytteet valmisteltiin tähän vaiheeseen asti ennen varsinaista analyysiä, ja niitä säilytettiin kylmiössä $+4^\circ\text{C}$:ssä analyysien aloitukseen saakka.

Analyysissä tarvittavaa standardisarjaa varten valmistettiin D-glukoosista 500 mg/l liuos 77 til.-%:een etanoliin. Tästä liuksesta laimennettiin standardisarja 77 til.-%:een etanoliin joka analyysikerralla. Standardien pitoisuudet olivat 0, 2,5, 25, 50, 75 ja 100 mg/l. Jokaista standardia tehtiin kaksi rinnakkaista näytettä.

Analyysi aloitettiin valmistamalla anthron-reagenssi; 0,200g anthronia ($\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{O}$) punnittiin ja liuotettiin 100 ml:aan 72-%:sta jääkylmää rikkihappoa (H_2SO_4). Reagenssi säilytettiin jäähauteessa valolta suojattuna käyttöön saakka. Uutetut näytteet laimennettiin ennen mittausta suhteessa 1:4 77 til.-%:een etanoliin. 250 μl laimennettua näytettä pipetoitiin 2 ml:n vetoiseen muoviseen kannelliseen koeputkeen ja lisättiin 1,25 ml jääkylmää anthron-reagenssia takaisinpipetointimenetelmällä. Myös standardeja pipetoitiin 250 μl ja lisättiin 1,25 ml reagenssia. Putket suljettiin ja sekoitettiin laboratoriosekoittimella, jonka jälkeen ne laitettiin kiehuvaan vesihauteeseen 11 minuutiksi. Keiton jälkeen näytteet ja standardit jäähdytettiin jää-vesi-hauteessa ja kaadettiin kyvetteihin. Tämän jälkeen niiden absorbanssit 630 nm aallonpituudella mitattiin spektrofotometrillä (Shimadzu UV-1800, Shimadzu corporation, Kyoto, Japan). Standardisuoran perusteella saatiin näytteiden liukoisten

sokerien pitoisuus mg/ml laimennettua näytettä. Tästä laskettiin kasvinäytteiden sokeripitoisuus kaavalla:

$$\frac{\text{sokeripitoisuus} \left(\frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right) \times \text{laimennoskerroin} \times \text{uuttotilavuus (ml)}}{\text{punnittu näytemäärä (g)}}$$

Laskussa käytettiin kahden rinnakkaisen mittauksen keskiarvoja. Tulokseksi saatiin liukoisten sokereiden pitoisuus mg/g kuivattua kasvinäytettä. Tulosten tarkentamiseksi määritettiin kuivattujen näytteiden kuiva-ainepitoisuus punnitsemalla näytteitä tarkasti noin 1 g posliiniupokkaaseen, kuivattamalla niitä 80 °C uunissa vuorokauden ajan ja punnitsemalla näyte uudelleen. Näin saadun kuiva-ainepitoisuuden avulla laskettiin sokeripitoisuus näytteen kuiva-aineessa (mg/kg ka) kaavalla:

$$\frac{\text{sokeripitoisuus} \left(\frac{\text{mg}}{\text{g}} \right)}{\text{kuiva - ainepitoisuus (\%)}} \times 100\%$$

4.5. Tärkkelyspitoisuuden määrittäminen

Kasvien juurten tärkkelyspitoisuus mitattiin sekä pelto- että kasvatuskaappikokeessa samalla menetelmällä. Versoista ei määritetty tärkkelyspitoisuutta lainkaan. Mittaukseen käytettiin valmista määrittämissarjaa (Total Starch Assay Kit, Megazyme international, Irlanti) joka sisälsi tarvittavat reagenssit, sekä ohjeen määrittämissä varten (Megazyme 2017b). Näytteiden analysoinnissa käytettiin ohjeen menetelmää e, jossa ensin poistettiin näytteestä liukoiset sokerit. Ensin valmistettiin ja laimennettiin ohjeen mukaan tarvittavat liuokset. 100 mg jauhettua näytettä punnittiin muoviseen 30 ml koeputkeen ja lisättiin 5 ml 80 % etanolia. Liukoisten sokerien poistamiseksi näytteitä uutettiin 85 °C vesihauteessa 5 minuuttia, minkä jälkeen ne sentrifugoitiin (10 min, 3000 rpm) ja supernatantti kaadettiin pois. Pelletti liuotettiin 10 ml:aan etanolia (80 %), sentrifugointi toistettiin ja supernatantti kaadettiin pois. Näytteisiin pipetoitiin 3 ml pakkauksen ohjeen mukaan laimennettua kuumuudenkestävää α -amylaasia ja laitettiin ne kiehuvaan vesihauteeseen 12 minuutiksi. Näytteitä sekoitettiin 4, 8 ja 12 minuutin kuluttua hauteeseen laittamisesta. Putkiin lisättiin 0,1 ml amyloglukosidaasia (määrittämissarjassa valmiina), sekoitettiin, ja laitettiin 30 minuutiksi 50 °C

vesihauteeseen. Tämän jälkeen lisättiin mQ- vettä niin että näytteen tilavuudeksi tuli 10 ml. Tätä liuosta pipetoitiin uusiin koeputkiin 0,1 ml ja lisättiin 3,0 ml pakkauksen ohjeen mukaan valmistettua GOPOD-reagenssia. Samalla valmistettiin d-glukoosikontrollit pakkauksen valmiista liuoksesta pipetoimalla 0,1 ml sitä ja 3,0 ml GOPOD- reagenssia ja nollakontrollit vastaavasti pipetoimalla 0,1 ml mQ-vettä ja 3,0 ml GOPOD:ia. Tämän jälkeen näytteet ja kontrollit laitettiin 30 minuutiksi 50 °C vesihauteeseen, jonka jälkeen niiden absorbanssit 510 nm aallonpituudella luettiin spektrofotometrillä (Shimadzu UV-1800, Shimadzu corporation, Kyoto, Japan). Spektrofotometrin lukemista laskettiin määrittämissarjan valmistajan taulukkolaskentapohjalla (Megazyme 2017a) näytteiden tärkkelyspitoisuudet. Laskennassa käytettiin samoja näytteiden kuiva- ainepitoisuuksia, jotka oli määritetty sokeripitoisuuksien laskentaa varten (katso luku 4.4.1).

4.6 Tulosten tilastollinen käsittely

Tilastolliset analyysit tehtiin IBM SPSS Statistics 23- ohjelmistolla (IBM Corp., Armonk, New York, USA). Peltokokeessa testattiin varianssianalyysillä näytteenottoajankohdan ja lajikkeen vaikutusta ionivuotoon +4, -10, -12 ja -14 °C testilämpötiloissa sekä näiden yhdysvaikutusta. Lisäksi kunkin näytteenottokuukauden sisällä testattiin lajikkeiden välisiä eroja ionivuodossa kaikilla käytetyillä kylmätestilämpötiloilla. Kuiva-aine-, tärkkelys- ja sokeripitoisuuksia testattiin kuukausien välillä ja joka kuukauden sisällä verrattiin lajikkeita toisiinsa varianssianalyysillä. Kaikkiin parittaisiin vertailuihin käytettiin Tukeyn testiä.

Kasvatускаappikokeessa versot ja juuret testattiin erikseen. Testit tehtiin samoin kuin peltokokeessa, karaistumis- ja kontrollikäsittelyjä verrattiin ensin keskenään ja sitten lajikkeita kunkin käsittelyn sisällä varianssianalyysin ja Tukeyn testin avulla.

5 Tulokset

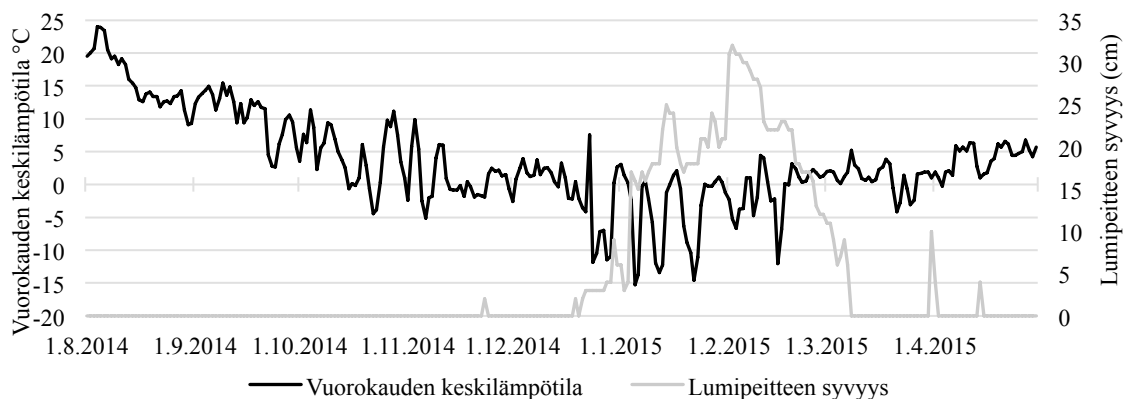
5.1 Kokeiden aikana tehdyt havainnot

5.1.1 Sääolot ja karaistuminen sekä talvituhot peltokokeessa

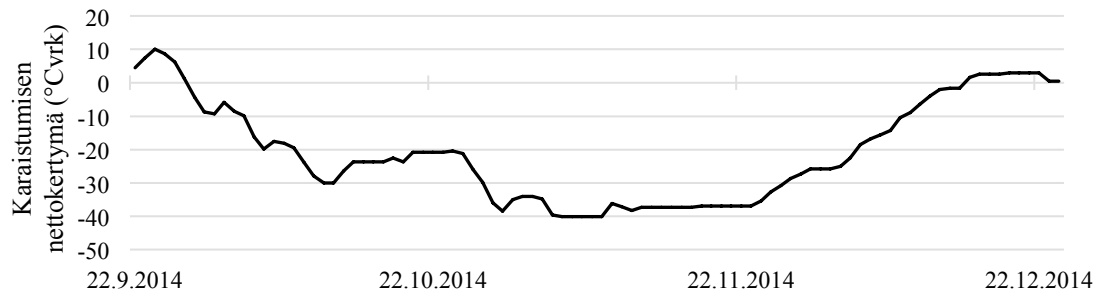
Terminen kasvukausi päättyi 12.10.2014. Karaistumiskausi alkoi kuitenkin jo noin kolme viikkoa aiemmin, kun 22.9.2014 vuorokauden keskilämpötila laski alle viiden celsiusasteen ensimmäistä kertaa (kuva 3). Karaistumiskausi päättyi 23.12.2014, kun seuraavana päivänä lämpötila laski ensimmäistä kertaa alle -10°C , ja sen kesto oli kaikkiaan 93 vrk. Pysyvä lumipeite tuli maahan 19.12.2014 ja kesti 78 vrk 6.3.2015 asti (kuva 3). Lumipeite suojasi kasvustoa kovimmilta pakkasilta, sillä sen sulamisen jälkeen vuorokauden keskilämpötila laski alimmillaan enää $-4,2^{\circ}\text{C}$:een.

Karaistumisjakson alkamisen jälkeen vuorokauden keskilämpötila nousi uudelleen yli $+5^{\circ}\text{C}$ ja karaistumisen nettokertymä oli enimmäkseen negatiivista aina 8.11. asti, jolloin kertymä oli $-40,1^{\circ}\text{Cvrk}$ (kuva 4). Tästä eteenpäin karaistumista alkoi kertyä ja karaistumisjakson lopuksi nettokertymä oli $+0,5^{\circ}\text{Cvrk}$.

Kaikki koeruudut olivat syksyllä täystiheitä (100 %). Talvituhoja havaittiin hyvin vähän. Ainoastaan 'Live' oli kärsinyt viiden prosentin talvituhon yhdessä koeruudussa ja 'Lavo' kahden prosentin talvituhon yhdessä ruudussa. Kaikki muut ruudut olivat täystiheitä vielä keväälläkin.



Kuva 3. Vuorokauden keskilämpötila ja lumipeitteen syvyys 1.8.2014 - 30.4.2015.

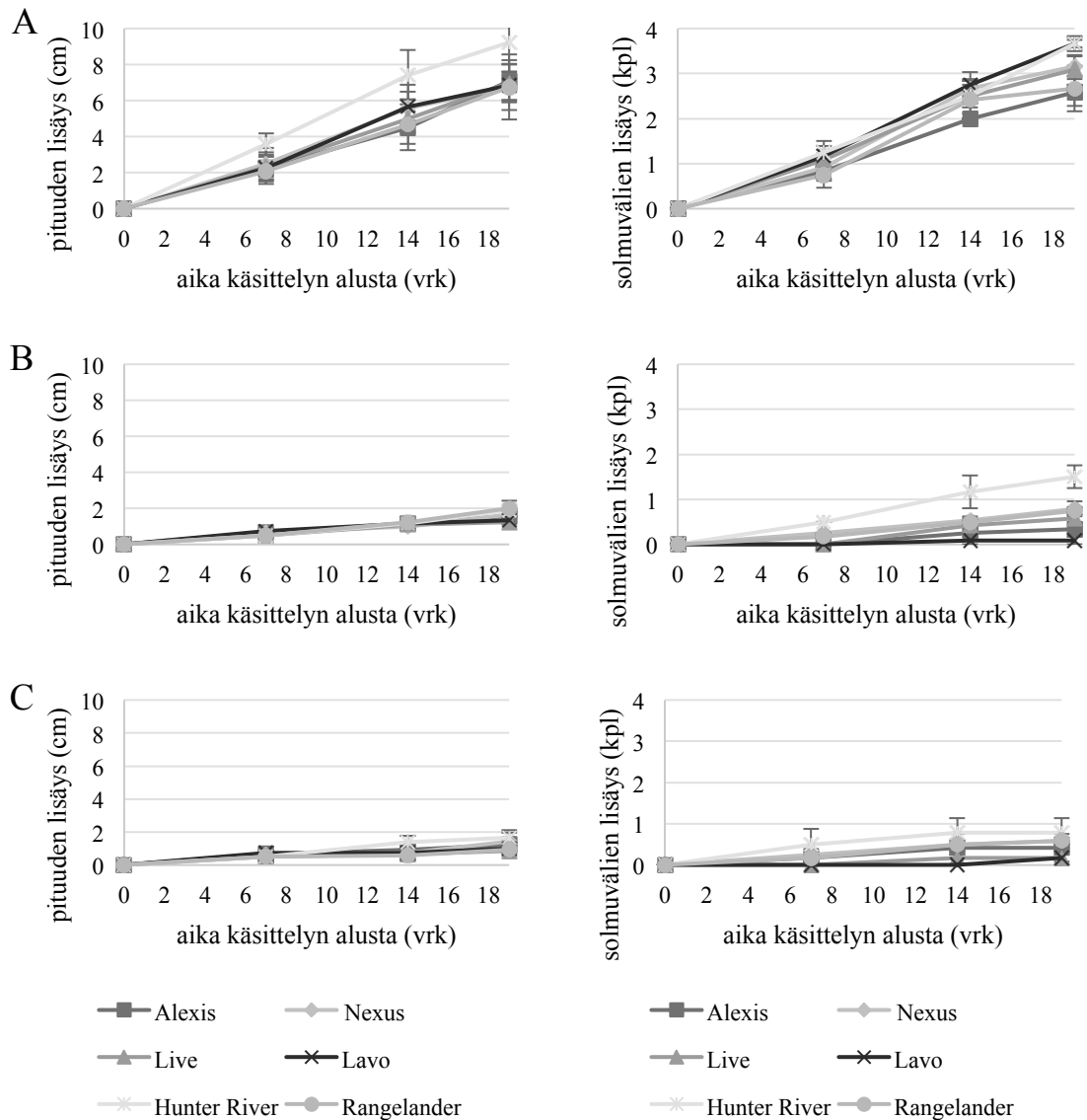


Kuva 4. Karaistumisen nettokertymän kehitys karaistumisjakson aikana.

5.1.2 Kasvien kasvun seuranta kasvatuskaappikokeessa

Karaistumiskäsittelyjen aloituksen jälkeen kasvien pituuskasvu lähes pysähtyi lukuun ottamatta kasvihuoneolosuhteissa olleita kontrollikasveja. Kummassakin karaistumiskäsittelyssä pituuskasvu koko käsittelyn aikana oli kaikilla lajikkeilla alle 2 cm (kuvat 5b ja 5c). Sen sijaan kasvihuonekontrollissa A 'Hunter river' kasvoi samassa ajassa keskimäärin 9,25 cm ja vähiten kasvaneet 'Nexus ja 'Rangelander' 6,75 cm (kuva 5a). Myös solmuväleissä näkyi sama vaikutus; karaistumiskäsittelyjen aikana kasveihin kehittyi keskimäärin alle yksi solmuväli (paitsi käsittelyssä B 'Hunter riverille' keskimäärin 1,5) (kuvat 5b ja 5c). Kasvihuoneoloissa kasvit jatkoivat kasvuaan ja lajikkeesta riippuen solmuvälejä kehittyi samassa ajassa 2,6- 3,7 (kuva 5a).

Karaistumiskäsittely vaikutti kaikkien lajikkeiden kasvuun merkitsevästi ($p < 0,001$) jokaisena mittausajankohtana (7, 14 ja 19 vrk käsittelyn alusta). Lajikkeella ei ollut kasvuun merkitsevää vaikutusta. Solmuvälien lisääntymiseen vaikutti kaikkina mittausajankohtina käsittely ($p < 0,001$), ja sen lisäksi lajikkeella oli vaikutus 14 ja 19 vuorokauden kuluttua käsittelyjen alusta ($p = 0,029$ ja $p < 0,001$). Lisäksi solmuvälien lisäykseen kohdistui käsittelyn ja lajikkeen yhdysvaikutus 19 vrk mittauksessa ($p = 0,023$). Parittaisten vertailujen (Tukey HSD, $p < 0,05$) mukaan kaikkina mittausajankohtina kasvihuonekontrollin pituuden ja solmuvälien lisäykset erosivat kummankin karaistumiskäsittelyn pituuden ja solmuvälin lisäyksistä. Sen sijaan karaistumiskäsittelyjen välillä näissä ei havaittu eroja.



Kuva 5. Sinimailasten pituuden ja solmuvälien määrän lisäys (A = kasvihuonekontrolli, B = 7/3 °C 3 vk, C = 7/3 °C 2 vk + 5/-2 °C 1vk) eri karaistumiskäsittelyjen aikana. Käsittelyn B ensimmäinen mittausväli on laskettu käsittelyn C perusteella koska ensimmäistä mittausta ei tehty ja kasvit olivat samoissa olosuhteissa ensimmäisen kahden viikon ajan. Virhepalkit kuvaavat keskiarvon keskivirhettä (\pm SEM, $n = 12$).

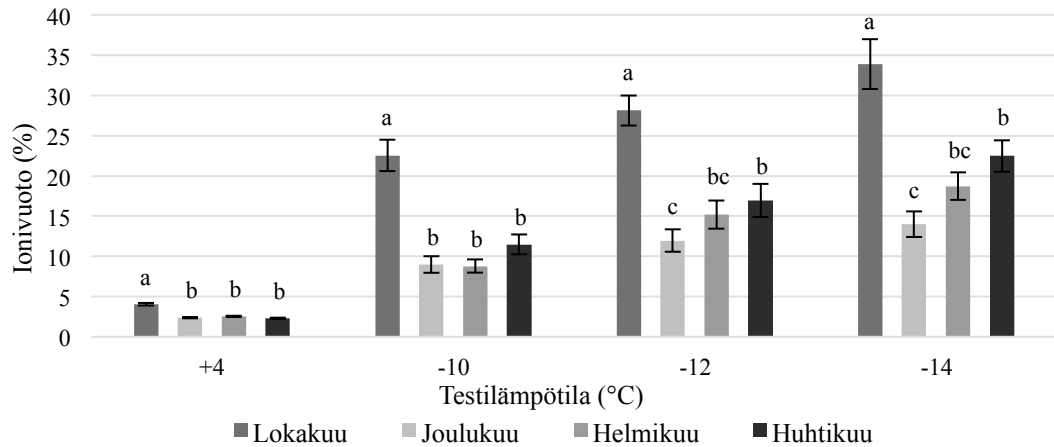
Käsittelyjen sisällä ei havaittu lajikkeiden välisiä eroja pituuden lisäyksessä. Solmuvälien lisäyksessä eroja ei löytynyt kasvihuonekontrollissa A eikä karaistumiskäsittelyssä C. Karaistumiskäsittely B jätettiin analysoimatta, koska ensimmäinen mittauskerta puuttui ja solmuvälien sekä pituuden lisäys ensimmäisen 7 vrk aikana oli tämän takia arvioitu käsittelyn C kanssa saman suuruisiksi. Kasvu voitiin olettaa samansuuruisiksi molemmissa käsittelyissä, koska kummankin käsittelyn olosuhteet olivat samanlaiset tässä vaiheessa.

5.2 Kylmänkestävyys

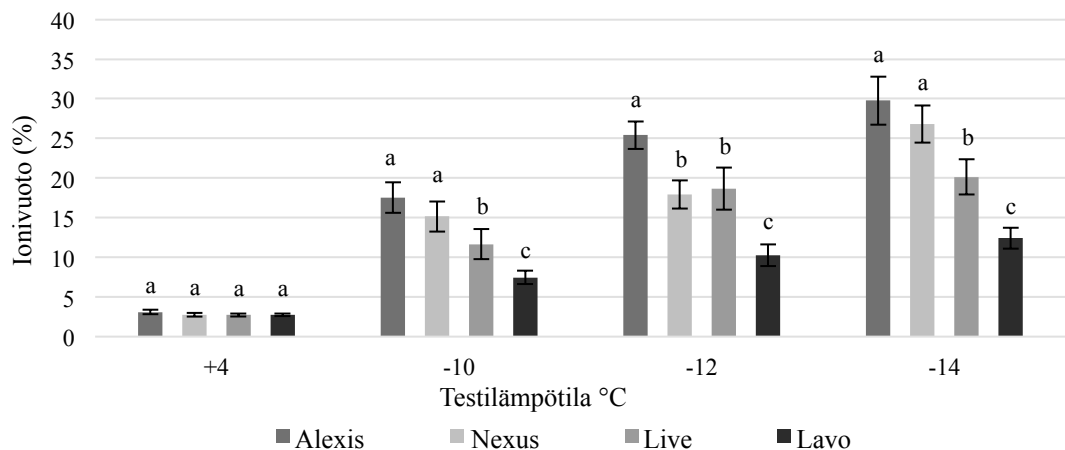
5.2.1 Peltokoe

Kylmätestissä havaittiin sekä näytteenottoajankohdalla että lajikkeella (lukuun ottamatta kontrollia (+4 °C)) olevan vaikutus ionivuotoon kaikissa testilämpötiloissa (p kaikissa $< 0,001$). Lisäksi -10 °C testilämpötilassa havaittiin yhdysvaikutus lajikkeen ja näytteenottoajankohdan välillä ($p = 0,038$). Lokakuussa ionivuodot olivat muita kuukausia suurempia (kuva 6). Lisäksi -12 °C ja -14 °C testilämpötiloissa joulukuun ionivuodot olivat huhtikuuta pienempiä (kuva 6). Lajikkeista 'Lavon' ionivuoto oli pienin ja 'Alexiksen' suurin (kuva 7). 'Nexus' ja 'Live' sijoittuivat ääripäiden väliin eroten joko toisistaan tai ääripäiden lajikkeista (kuva 7).

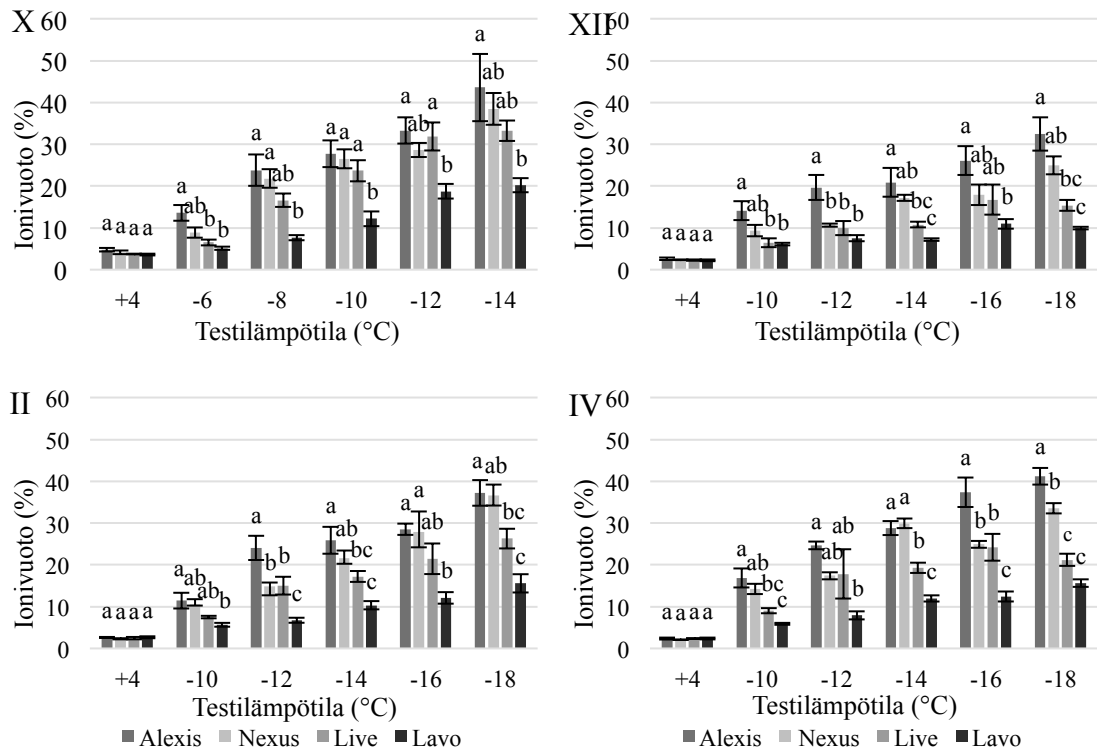
Analysoitaessa lajikkeiden välisiä eroja kunkin kuukauden sisällä ei saavutettu yhtenäkkään kuukautena yhdelläkään lajikkeella yli 50 % ionivuotoa, joten ei päästy määrittämään lajikkeiden LT50-arvoja. Lajike vaikutti kontrollia (+4 °C) lukuun ottamatta kaikissa testilämpötiloissa merkitsevästi kylmänkestoon. 'Lavo' oli kaikkina kuukausina kylmänkestävin lajike ja eroavuus muihin lajikkeisiin näkyi selvimmin alimmissa testilämpötiloissa (kuva 8). Kaikkien kuukausien kaikissa testilämpötiloissa 'Lavon' ionivuoto oli pienempi kuin 'Alexiksen' (kuva 8). Muista lajikkeista 'Lavo' erosi vaihtelevasti (kuva 8). Joului- helmii- ja huhtikuussa myös 'Live' oli useimmissa testilämpötiloissa ionivuodoltaan selvästi 'Alexista' pienempi. 'Nexus' ei useimmiten eronnut 'Alexiksesta', mutta esimerkiksi huhtikuussa kylmimmissä testilämpötiloissa se oli ionivuodoltaan 'Alexista' pienempi mutta 'Lavaa' suurempi.



Kuva 6. Sinimailaslajikkeiden keskimääräinen ionivuoto peltokokeessa prosentteina eri kuukausina kolmessa eri testilämpötilassa (-10, -12 ja -14 °C) sekä kontrollikäsitellyssä (+4 °C). Samalla kirjaimella merkityt näytteenottoajankohdat eivät eroa toisistaan samassa kylmätestilämpötilassa (tukey HSD, $p < 0,05$). Virhepalkit kuvaavat keskiarvon keskivirhettä (\pm SEM, $n = 16$).



Kuva 7. Sinimailaslajikkeiden ionivuodon kaikkien kuukausien keskiarvo prosentteina peltokokeessa kolmessa eri testilämpötilassa (-10, -12 ja -14 °C) sekä kontrollikäsitellyssä (+4 °C). Samalla kirjaimella merkityt lajikkeet eivät eroa toisistaan samassa kylmätestilämpötilassa (tukey HSD, $p < 0,05$). Virhepalkit kuvaavat keskiarvon keskivirhettä (\pm SEM, $n = 16$).



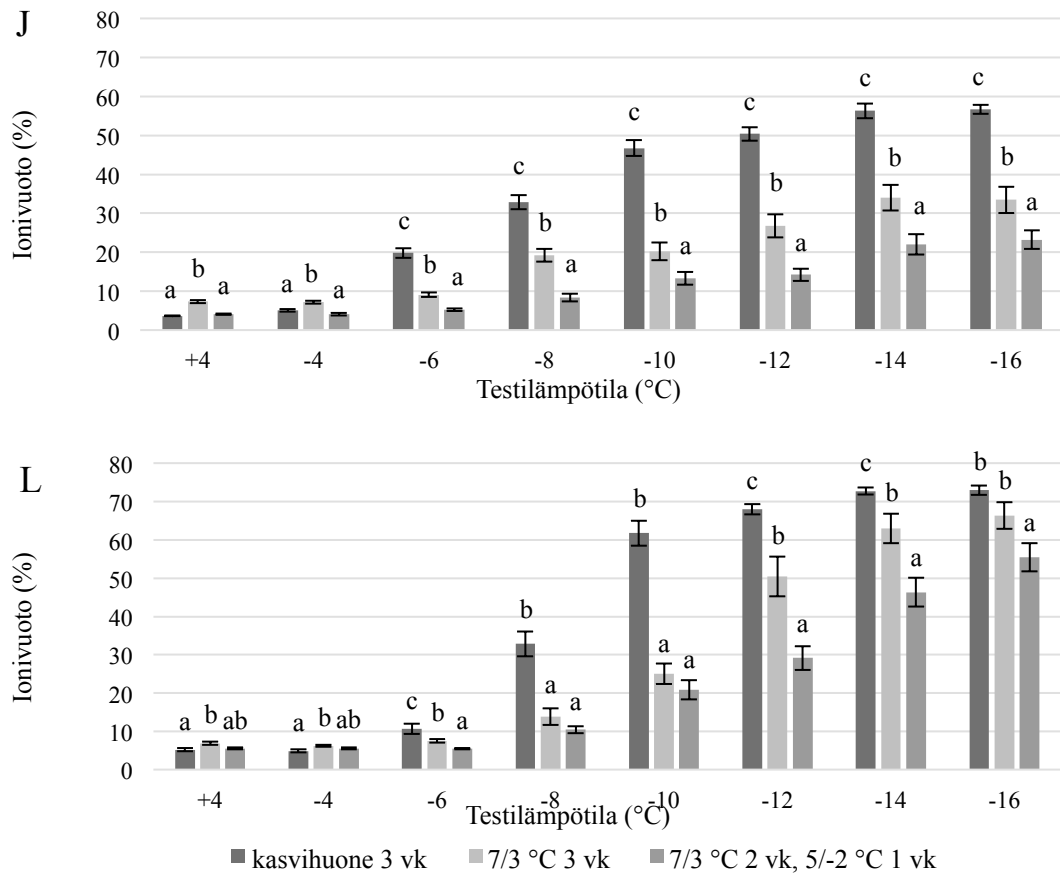
Kuva 8. Sinimailaslajikkeiden ionivuoto prosentteina eri testilämpötiloissa eri näytteenottoajankohtina (X = lokakuu, XII = joulukuu, II = helmikuu ja IV = huhtikuu). Huomaa, että lokakuussa testilämpötilat ovat muita kuukausia lämpimämmät ja +4 °C testilämpötila on kontrollikäsitteily. Samalla kirjaimella merkityt lajikkeet eivät eroa toisistaan merkitsevästi samassa kylmätestilämpötilassa (tukey HSD, $p < 0,05$) Virhepalkit kuvaavat keskiarvon keskivirhettä (\pm SEM, $n = 4$).

5.2.2 Kasvatustaappikoe

Karaistumiskäsittely vaikutti tilastollisesti merkitsevästi sekä sinimailasten juurten että lehtien ionivuotoon kaikissa kylmätestilämpötiloissa mukaan lukien kontrolli +4 °C ($p \leq 0,022$). Lajike puolestaan vaikutti merkitsevästi juurten ionivuotoon kaikissa testilämpötiloissa ja lehtien ionivuotoon -6 °C:ssa ja sitä alhaisemmissa testilämpötiloissa ($p \leq 0,006$). Lajikkeella ja käsittelyllä oli myös yhdysvaikutusta; juurissa yhdysvaikutus havaittiin +4 °C, -6 °C, -8 °C sekä -16 °C testilämpötiloissa ja lehdissä -6 °C, -12 °C, -14 °C sekä -16 °C testilämpötiloissa.

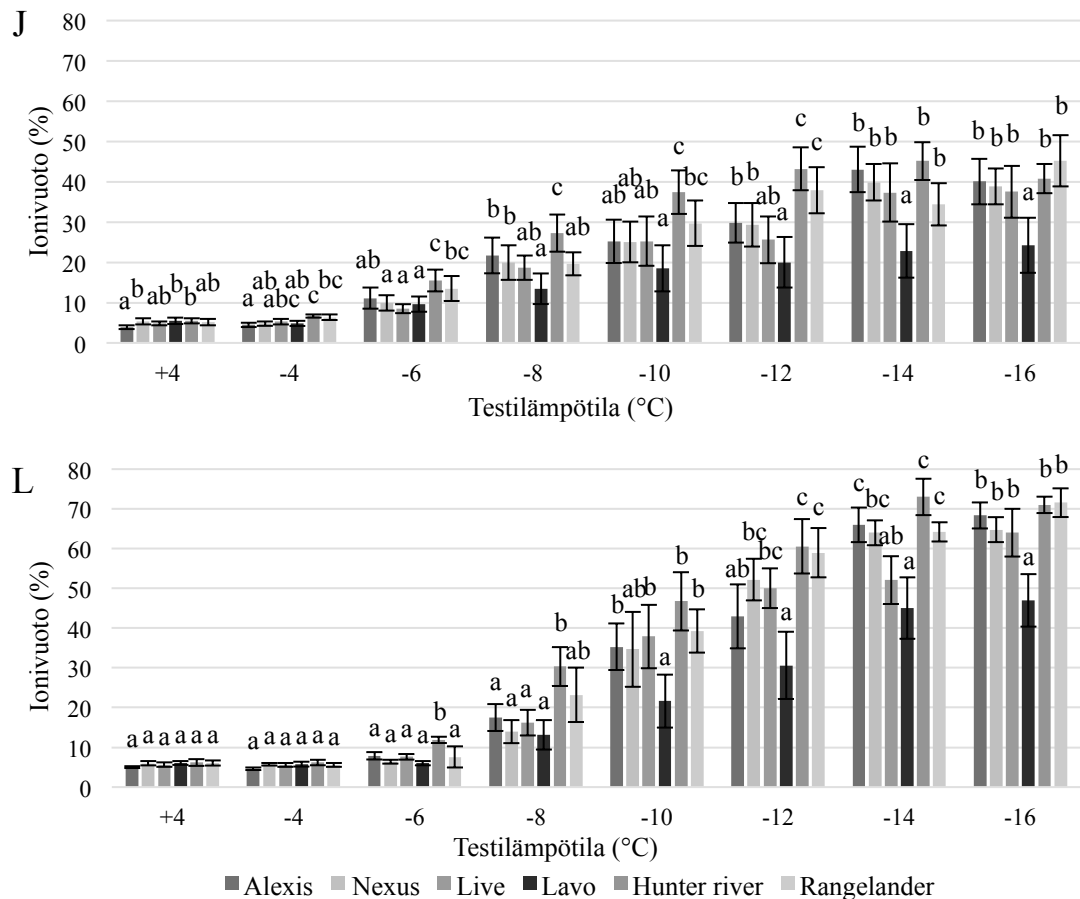
Karaistumiskäsittelyjen vaikutus tuli selkeästi esille parittaisessa vertailussa. Juurien ionivuoto oli suurin kasvihuonekontrollissa A, pienin käsittelyssä C ja käsittelyn B ionivuoto jäi näiden kahden väliin kaikissa muissa paitsi +4 ja -4 °C testilämpötiloissa (kuva 9). Karaistumattomien kasvien juurten ionivuoto oli näissä lämpötiloissa

parhaiten karaistuneisiin verrattuna noin 2,5–4 -kertainen. Sama järjestys havaittiin myös lehtikiekkujen ionivuodossa (kuva 9), mutta kaikki käsittelyt erosivat merkitsevästi toisistaan vain -6, -12 ja -14 °C testilämpötiloissa.



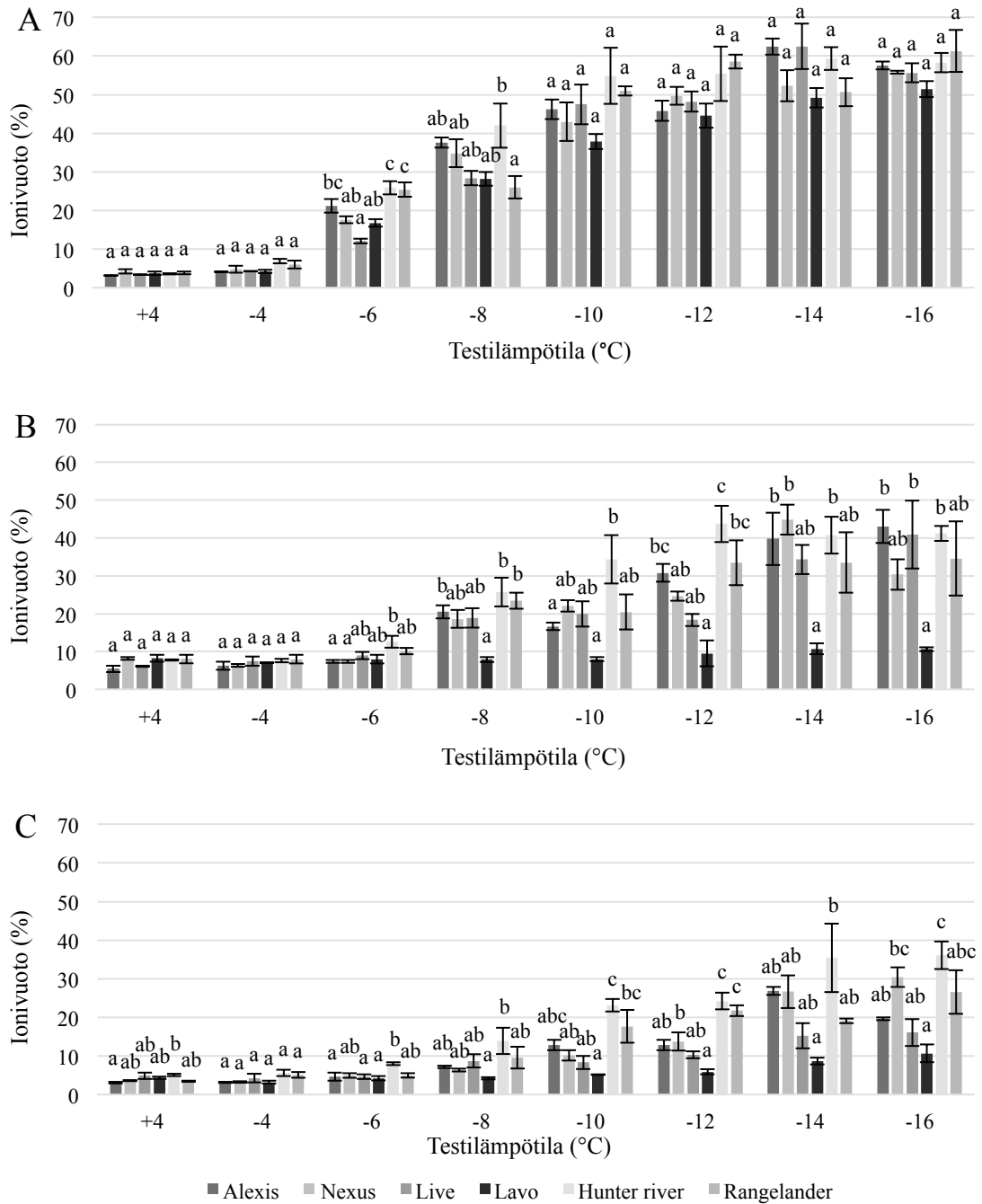
Kuva 9. Kasvatuskaappikokeen sinimailasten juurten (J) ja lehtikiekkujen (L) keskimääräinen ionivuoto prosentteina eri karaistumiskäsittelyissä ja kylmätestitestilämpötiloissa sekä kontrollitestilämpötilassa (+4 °C). Samalla kirjaimella merkityt karaistumiskäsittelyt eivät eroa toisistaan samassa kylmätestilämpötilassa (tukey HSD, $p < 0,05$). Virhepalkit kuvaavat keskiarvon keskivirhettä (\pm SEM, $n = 18$).

Lajikkeiden välisessä vertailussa 'Lavon' ionivuoto sekä juurista että lehdistä oli muita lajikkeita pienempi kylmimmissä testilämpötiloissa (kuva 10). 'Hunter riverin' ja juurten ionivuoto puolestaan oli muita lajikkeita (paitsi useimmiten 'Rangelanderia') suurempi suhteellisen lämpimissä -6, -8, -10 ja -12 °C testilämpötiloissa (kuva 10). Myös lehtien ionivuoto oli yleensä 'Hunter riverillä' ja 'Rangelanderilla' suurin, mutta tilastollisesti merkitseviä eroja oli useimmissa testilämpötiloissa vain joihinkin lajikkeisiin (kuva 10).



Kuva 10: Kasvatuskaappikokeen sinimailaslajikkeiden juurten (J) ja lehtikiekkujen (L) keskimääräinen ionivuoto eri kylmätestilämpötiloissa ja kontrollilämpötilassa (+4 °C). Samalla kirjaimella merkityt lajikkeet eivät eroa toisistaan samassa kylmätestilämpötilassa (tukey HSD, $p < 0,05$). Virhepalkit kuvaavat keskiarvon keskivirhettä (\pm SEM, $n = 9$).

Verrattaessa lajikkeita kunkin käsittelyn sisällä, kontrollikäsittelyssä A lajike vaikutti juurten ionivuodon suuruuteen merkitsevästi -4, -6 ja -8 °C testilämpötiloissa. Parittaisessa vertailussa lajikkeiden välisiä eroja löytyi kuitenkin vain -6 ja -8 °C testilämpötiloissa (kuva 11a). 'Liven' ionivuoto -6 °C lämpötilassa oli kaikkia muita lajikkeita, paitsi 'Lavo' ja 'Nexusta' pienempi. 'Lavon' ja 'Nexuksen' ionivuoto oli lisäksi 'Hunter riveriä' ja 'Rangelanderia' pienempi. Kylmemmässä (-8 °C) testilämpötilassa ainoastaan 'Rangelanderin' ionivuoto oli pienempi kuin 'Hunter riverin', muita eroja ei löytynyt.



Kuva 11. Sinimailaslajikkeiden juurten ionivuoto prosentteina eri testilämpötiloissa ja karaistumiskäsittelyissä (A = kasvihuonekontrolli, B = 7/3 °C 3 vk, ja C = 7/3 °C 2 vk + 5/-2 °C 1vk). +4 °C testilämpötila on kontrollikäsittely. Samalla kirjaimella merkityt lajikkeet eivät eroa toisistaan merkitsevästi samassa kylmätestilämpötilassa (tukey HSD, $p < 0,05$) Virhepalkit kuvaavat keskiarvon keskivirhettä (\pm SEM, $n = 3$).

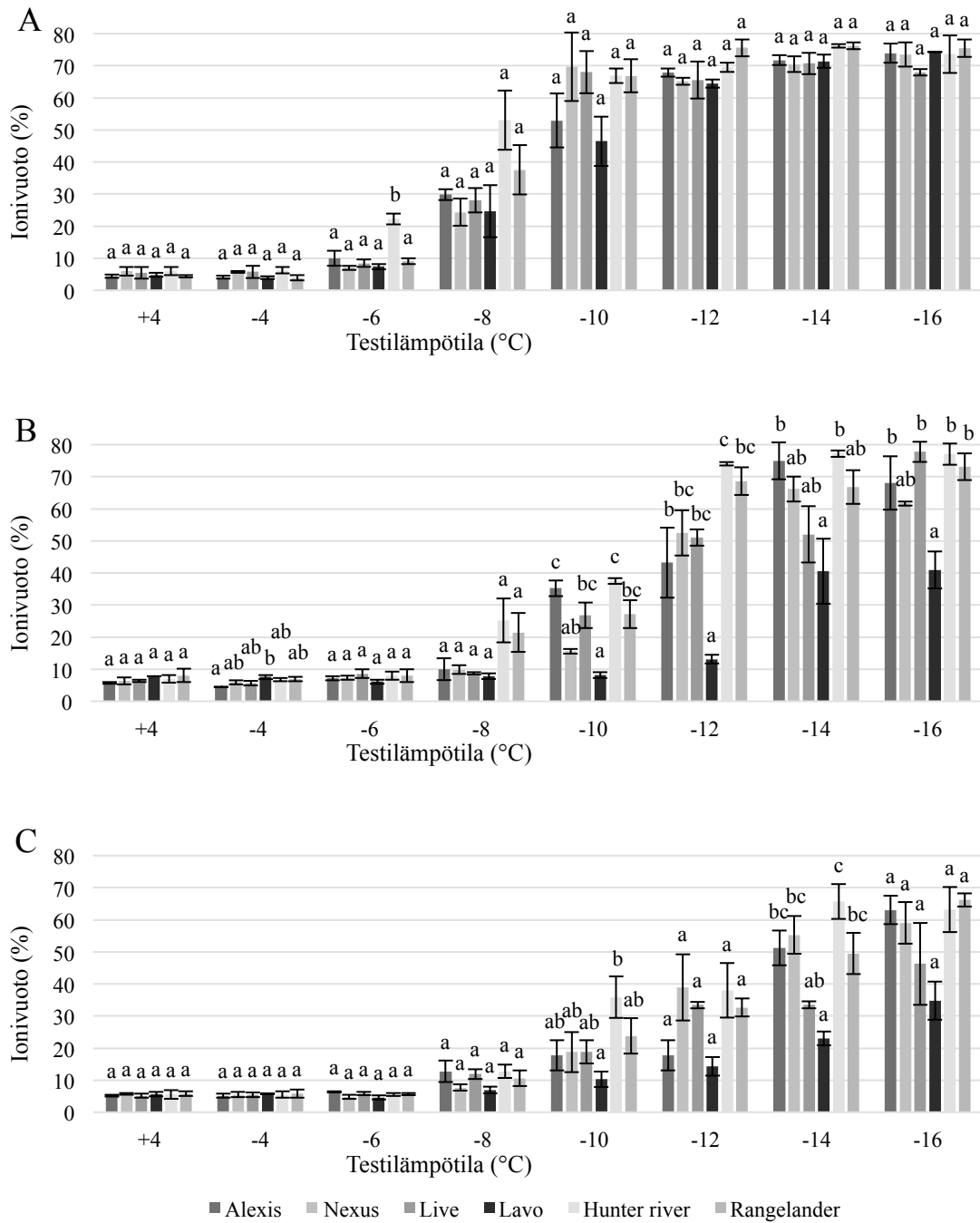
4 – 5

Karaistumiskäsittelyssä B lajike vaikutti merkitsevästi juurten ionivuodon suuruuteen -6 – -16 °C testilämpötiloissa. Parittaisen vertailun perusteella -6 °C testilämpötilassa 'Alexiksen' ja 'Nexuksen' ionivuoto oli 'Hunter Riveriä' pienempi. Kylmemmissä testilämpötiloissa 'Lavon' ionivuoto oli aina pienin. Ero oli kaikissa näissä

lämpötiloissa merkitsevä 'Hunter riveriin' verrattuna. 'Lavon' eroavuudet muihin lajikkeisiin vaihtelivat testilämpötilojen välillä ja eri testilämpötiloissa muut lajikkeet erosivat toisistaan vaihtelevasti (kuva 11b).

Karaistumiskäsittelyssä C lajike vaikutti juurten ionivuotoon merkitsevästi kontrollitestilämpötilassa (+4 °C) sekä -6, -10, -12, -14 ja -16 °C testilämpötiloissa. Kontrollilämpötilan parittaisessa vertailussa 'Alexiksella' oli 'Hunter riveriä' merkitsevästi pienempi ionivuoto, joka tosin oli hyvin pieni, korkeintaan 5% kaikilla lajikkeilla. 'Alexis', 'Live ja 'Lavo' olivat -6 °C testilämpötilassa ionivuodoltaan 'Hunter riveriä' pienempiä, mutta tässäkin lämpötilassa kaikkien lajikkeiden ionivuoto oli vielä varsin pieni, alle 10 %. Vasta -10 °C lämpötilasta alaspäin ionivuotojen erot alkoivat tulla paremmin esiin. 'Lavon' ionivuoto oli -10 - -16 °C lämpötiloissa kaikista pienin ja se erosi 'Hunter riveristä' merkitsevästi näissä kaikissa lämpötiloissa. Muut lajikkeet asettuivat näiden kahden välille. 'Livellä' oli matalimmissa testilämpötiloissa toiseksi pienin ionivuoto ja se ei eronnutkaan merkitsevästi 'Lavosta', kuten ei myöskään 'Alexis'. 'Nexus' erosi matalammalla ionivuodollaan 'Hunter riveristä' -10 ja -12 °C:ssa, mutta -14 ja -16 °C lämpötiloissa ei. Sen sijaan -16 °C:ssa sen ionivuoto oli merkitsevästi "Lavoa" suurempi. 'Rangelander' ei eronnut -10 - -16 °C lämpötiloissa 'Hunter riveristä', sen sijaan sen ionivuoto oli vaihtelevasti muita lajikkeita korkeampi (kuva 11c).

Kontrollikäsittelyssä A lajike vaikutti merkitsevästi lehtikiekkujen ionivuotoon vain -6 °C testilämpötilassa, jolloin 'Hunter riverin' ionivuoto oli kaikkia muita lajikkeita suurempi (kuva 12a). Karaistumiskäsittelyssä B lajike vaikutti merkitsevästi ionivuotoon -4 ja -8 - -16 °C kylmätestilämpötiloissa. Parittaisissa vertailuissa -4 °C:ssa 'Lavon' ionivuoto oli 'Alexista' suurempi, mutta kaikkiaan ionivuodot ja niiden väliset erot olivat hyvin pieniä (kuva 12b). Varianssianalyysin merkitsevyydestä huolimatta -8 °C testilämpötilassa parittaisessa vertailussa ei löytynyt eroja lajikkeiden väliltä. Kylmemmissä testilämpötiloissa 'Lavon' ionivuoto oli pienin, se erosi joko kaikista muista lajikkeista (-12 °C) tai ainakin osasta. Muiden lajikkeiden keskinäiset erot eivät olleet yhtä selkeitä eri käsittelyissä.



Kuva 12. Sinimailaslajikkeiden lehtikiekkujen ionivuoto prosentteina eri testilämpötiloissa ja karaistumiskäsittelyissä (A = kasvihuonekontrolli, B = 7/3 °C 3 vk, ja C = 7/3 °C 2 vk + 5/-2 °C 1vk). +4 °C testilämpötila on kontrollikäsittely. Samalla kirjaimella merkityt lajikkeet eivät eroa toisistaan merkitsevästi samassa kylmätestilämpötilassa (tukey HSD, $p < 0,05$) Virhepalkit kuvaavat keskiarvon keskivirhettä (\pm SEM, $n = 3$).

Karaistumiskäsittelyssä C havaittiin lajikkeen vaikuttavan kylmänkestoon merkitsevästi ainoastaan -14° C testilämpötilassa. Tällöin 'Lavon' ionivuoto oli 'Liveä' lukuun ottamatta muita lajikkeita pienempi ja sekä 'Lavon' että 'Liven' ionivuodot olivat 'Hunter riverin' ionivuotoa pienemmät (kuva 12c). Lisäksi -10 °C testilämpötilassa varianssianalyysin mukaan erot olivat ainoastaan suuntaa-antavia ($p = 0,063$), mutta parittaisessa vertailussa kuitenkin 'Lavon' ionivuoto oli 'Hunter riveriä' pienempi.

5.3 Kuiva-aineen, sokerin ja tärkkelyksen pitoisuuksien muutokset

5.3.1 Peltokoe

Talven edetessä versojen kuiva-ainepitoisuus lisääntyi ja juurten kuiva-ainepitoisuus väheni (taulukko 4). Lokakuussa versot olivat vielä pääosin eläviä, mutta muina kuukausina ne koostuivat lähinnä kuolleesta kasvimateriaalista. Kuitenkin vain huhtikuussa versojen kuiva-ainepitoisuus erosi merkitsevästi muista kuukausista. Juurissa kuiva-ainepitoisuus oli suurimmillaan lokakuussa. Joului- ja helmikuussa se oli alentunut lokakuuhun verrattuna, mutta ei eronnut näiden kahden kuukauden välillä. Huhtikuussa sen sijaan kuiva-ainepitoisuus oli alentunut merkitsevästi talvikuukausiin verrattuna.

Juurien sokeripitoisuus kasvoi talvea kohti, mutta keväällä aleni jälleen (taulukko 4). Se oli korkeimmillaan helmikuussa eroten merkitsevästi sekä lokakuusta, että huhtikuusta. Joulukuussakin sokeripitoisuus erosi merkitsevästi huhtikuusta, muttei lokakuusta eikä helmikuusta. Versojen sokeripitoisuus määritettiin ainoastaan lokakuussa, koska myöhemmin talvella niiden kasviaines oli pääosin kuollutta.

Juurten tärkkelyspitoisuus puolestaan aleni talven aikana (taulukko 4). Lokakuusta joulukuuhun mennessä juurten tärkkelyspitoisuus oli alentunut noin kolmasosaan lokakuusta ja huhtikuussa juurten tärkkelyspitoisuus oli enää 1/8 lokakuudesta pitoisuudesta.

Kuukausittain analysoituina lajikkeiden väliltä löytyi eroja kaikista määritetyistä pitoisuuksista version liukoisia sokereita (määritetty ainoastaan lokakuussa) lukuun

ottamatta, mutta ei kaikkina kuukausina (taulukko 5). Versojen kuiva-ainepitoisuus oli lokakuussa 'Alexiksella' muita lajikkeita matalampi, muina kuukausina siinä ei ollut lajikkeiden välisiä eroja. Juurien kuiva-ainepitoisuus oli lokakuussa 'Livellä' korkeampi kuin 'Alexiksella' ja joulukuussa korkeampi kuin 'Alexiksella' ja 'Nexuksella'. Muiden lajikkeiden välillä ja muina kuukausina ei ilmennyt merkitseviä eroja.

Taulukko 4. Kaikkien sinimailaslajikkeiden kuiva-aine-, liukoisten sokerien ja tärkkelyspitoisuuksien keskiarvot eri näytteenottoaikoina. Samalla kirjaimella samassa sarakkeessa merkityt pitoisuudet eivät eroa toisistaan merkitsevästi (tukey HSD, $p < 0,05$). Hajontalukuna on esitetty keskiarvon keskivirhe (SEM). em. = ei määritetty.

kuukausi	n	Kuiva-ainepitoisuus g/kg		Liukoiset sokerit mg/ g ka		Tärkkelys mg/ g ka
		versot	juuret	versot	juuret	juuret
lokakuu	16	198 ± 3a	291 ± 8a	113 ± 8	244 ± 14ab	137,5 ± 15,1a
joulukuu	16	224 ± 11a	250 ± 6b	em.	269 ± 9bc	45,8 ± 6,7b
helmikuu	16	225 ± 5a	248 ± 5b	em.	279 ± 9c	20,9 ± 2,8bc
huhtikuu	16	299 ± 13b	226 ± 5c	em.	227 ± 8a	16,8 ± 2,6c

Taulukko 5. Sinimailaslajikkeiden kuiva-aine-, liukoisten sokerien ja tärkkelyspitoisuus peltokokeessa eri näytteenottoaikoina. Samana ajankohtana määritetyt samalla kirjaimella merkityt pitoisuudet eivät eroa toisistaan merkitsevästi (tukey HSD, $p < 0,05$). Hajontalukuna on esitetty keskiarvon keskivirhe (SEM). Kaikilla lajikkeilla $n = 4$. em. = ei määritetty.

	Lajike	Kuiva-ainepitoisuus g/kg		Liukoiset sokerit mg/g ka		Tärkkelys mg/g ka
		versot	juuret	versot	juuret	juuret
lokakuu	Alexis	180 ± 2a	267 ± 10a	103 ± 17	183 ± 14a	192,1 ± 3,9
	Nexus	205 ± 7b	276 ± 4ab	115 ± 23	219 ± 11ab	119,0 ± 38,7
	Live	205 ± 5b	321 ± 20b	139 ± 10	256 ± 11b	107,9 ± 37,0
	Lavo	201 ± 1b	302 ± 10ab	93 ± 7	317 ± 19c	131,1 ± 16,4
joulukuu	Alexis	191 ± 15	236 ± 16a	e.m	237 ± 10	33,2 ± 9,0
	Nexus	210 ± 18	246 ± 6a	e.m	277 ± 14	43,4 ± 13,1
	Live	241 ± 24	262 ± 9b	e.m	267 ± 24	74,0 ± 13,3
	Lavo	252 ± 19	258 ± 12ab	e.m	295 ± 13	32,5 ± 9,2
helmikuu	Alexis	209 ± 14	230 ± 10	e.m	250 ± 22a	17,9 ± 5,0a
	Nexus	225 ± 7	253 ± 8	e.m	262 ± 10a	20,5 ± 2,5ab
	Live	243 ± 3	263 ± 6	e.m	275 ± 5ab	34,5 ± 4,1b
	Lavo	223 ± 12	246 ± 12	e.m	327 ± 7b	10,6 ± 2,4a
huhtikuu	Alexis	306 ± 31	219 ± 13	e.m	197 ± 26	12,5 ± 2,6a
	Nexus	281 ± 13	215 ± 6	e.m	238 ± 7	11,2 ± 4,1a
	Live	332 ± 40	233 ± 5	e.m	242 ± 13	30,8 ± 3,0b
	Lavo	276 ± 7	234 ± 11	e.m	233 ± 11	12,7 ± 3,3a

Juurien liukoisten sokerien pitoisuus oli huhtikuuta lukuun ottamatta korkein 'Lavolla', tosin joulukuussa tilastollisesti merkitseviä lajike-eroja ei ollut suuren hajonnan takia (Taulukko 5). Lokakuussa 'Lavo' erosi kaikista muista lajikkeista ja myös 'Liven' sokeripitoisuus oli merkitsevästi korkeampi, kuin 'Alexiksen'. Helmikuussa 'Lavon' sokeripitoisuus oli 'Alexista' ja 'Nexusta' korkeampi, mutta 'Livestä' se ei eronnut merkitsevästi. Huhtikuussa lajikkeiden välillä ei juurten sokeripitoisuudessa havaittu merkitseviä eroja.

5.3.2 Kasvatuskaappikoe

Karaistumiskäsittelyt vaikuttivat versojen kuiva-aine- ja sokeripitoisuuksiin sekä juurten kuiva-aine-, sokeri- ja tärkkelyspitoisuuksiin (kaikissa $p < 0,001$). Sen sijaan lajike vaikutti ainoastaan version sokeripitoisuuteen ($p < 0,001$), johon lajikkeella ja käsittelyllä oli myös yhdysvaikutus ($p = 0,008$).

Versojen kuiva-ainepitoisuus kasvoi sekä karaistumiskäsittelyissä, että kasvihuonekontrollissa alkutilanteeseen verrattuna (taulukko 6). Myös juurten kuiva-ainepitoisuus kasvoi sekä käsittelyissä että kontrollissa alkutilanteeseen verrattuna, käsittelyssä B enemmän kuin käsittelyssä C. Kasvihuonekontrollin A kuiva-ainepitoisuus jäi karaistumiskäsittelyjen väliin, eikä eronnut merkitsevästi kummastakaan.

Karaistumiskäsittelyt nostivat versojen sokeripitoisuuden noin 2,5-3-kertaiseksi ja juurien sokeripitoisuuden noin 3,5-kertaiseksi lähtötilanteeseen verrattuna (taulukko 6). Sen sijaan kasvihuonekontrollin (A) ja lähtötilanteen (D) sokeripitoisuudet eivät eronneet toisistaan merkitsevästi versoissa eikä juurissa. Versojen sokeripitoisuus nousi käsittelyssä C enemmän kuin käsittelyssä B, mutta juurten sokeripitoisuudessa ei karaistumiskäsittelyjen välillä ollut eroa.

Juurten tärkkelyspitoisuus nousi kasvihuonekontrollissa (A) yli kaksinkertaiseksi lähtötilanteeseen (D) verrattuna (taulukko 6). Karaistumiskäsittelyissä

tärkkelyspitoisuus laski lähtötilannetta matalammaksi. Karaistumiskäsittelyiden tärkkelyspitoisuudet eivät kuitenkaan eronneet toisistaan tilastollisesti merkitsevästi.

Taulukko 6. Kaikkien lajikkeiden kuiva-aine-, liukoisten sokereiden ja tärkkelyspitoisuuden keskiarvot kasvatuskaappikokeen eri käsittelyissä (A = kasvihuonekontrolli, B = 7/3 °C 3 vk, C = 7/3 °C 2 vk + 5/-2 °C 1 vk ja D = ennen käsittelyjä kerätyt näytteet). Samalla kirjaimella merkityt pitoisuudet eivät eroa toisistaan merkitsevästi (tukey HSD, $p < 0,05$). Hajontalukuna on esitetty keskiarvon keskivirhe (SEM). Ennen käsittelyjä $n = 12$, käsittelyissä ja kontrollissa $n = 18$.

Käsittely	Kuiva-aine g/kg		Sokeri g/kg ka		Tärkkelys g/kg ka
	Verso	Juuret	Verso	Juuret	Juuret
A	246 ± 11,5b	310 ± 10bc	35,3 ± 2,1a	97,9 ± 16,0a	293,0 ± 10,5c
B	254 ± 2,7b	326 ± 10c	132,0 ± 9,6b	247,3 ± 18,3b	83,2 ± 11,0a
C	241 ± 2,9b	277 ± 6b	157,1 ± 8,1c	246,8 ± 14,2b	76,8 ± 9,1a
D	195 ± 3,4a	165 ± 6a	52,7 ± 4,0a	68,0 ± 3,8a	131,9 ± 13,4b

Käsittelyjen sisällä lajike-eroja oli ainoastaan versojen liukoisen sokerin pitoisuudessa (taulukko 7). Kontrollikäsittelyssä A 'Rangelanderin' sokeripitoisuus oli merkitsevästi suurempi kuin 'Liven' ja 'Hunter Riverin'. Karaistumiskäsittelyssä B 'Alexiksen' ja 'Lavon' versojen sokeripitoisuudet olivat yli kaksinkertaiset verrattuna 'Hunter Riveriin' ja erosivat merkitsevästi siitä. Karaistumiskäsittelyssä C 'Lavo' erosi korkeammalla sokeripitoisuudellaan kaikista muista lajikkeista paitsi 'Nexuksesta'.

Taulukko 7. Sinimailaslajikkeiden kuiva-aine-, liukoinen sokeri- ja tärkkelyspitoisuus kasvatustaapikokeessa eri käsittelyissä (A=kasvihuonekontrolli, B=7/3 °C 3 vk, C=7/3 °C 2 vk + 5/-2 °C 1vk ja D=ennen käsittelyjä kerätyt näytteet). Samalla kirjaimella merkityt pitoisuudet eivät eroa toisistaan merkitsevästi (tukey HSD, $p < 0,05$) saman käsittelyn sisällä. Hajontalukuna on esitetty keskiarvon keskivirhe (SEM). Ennen käsittelyjä $n=2$, käsittelyissä ja kontrollissa $n=3$.

Käsittely	Lajike	Kuiva-aine g/kg		Liukoiset sokerit g/kg ka		Tärkkelys (g/ kg ka)
		Verso	Juuret	Verso	Juuret	Juuret
A	Alexis	239 ± 8	341 ± 13	33,6 ± 7,2ab	155,2 ± 92,8	270,2 ± 50,9
	Nexus	232 ± 3	297 ± 12	32,2 ± 2,1ab	121,8 ± 31,0	261,6 ± 19,4
	Live	303 ± 68	302 ± 46	28,5 ± 2,7a	78 ± 9,6	291,9 ± 16,6
	Lavo	232 ± 4	301 ± 1	38,1 ± 1,9ab	87,4 ± 18,2	300,6 ± 5,5
	Hunter River	230 ± 1	326 ± 11	30 ± 3,9a	71,3 ± 12,4	321 ± 18,7
	Rangelander	238 ± 6	339 ± 15	49,2 ± 1,9b	73,7 ± 4,8	313 ± 24,0
B	Alexis	245 ± 3	347 ± 26	167,2 ± 31,5b	283,6 ± 77,9	73,4 ± 33,0
	Nexus	261 ± 7	328 ± 25	139 ± 7,9ab	275,2 ± 55,0	70,9 ± 11,6
	Live	261 ± 6	330 ± 31	132,9 ± 22,4ab	243,8 ± 37,8	56,6 ± 19,7
	Lavo	260 ± 3	298 ± 24	157,7 ± 7,5b	247,6 ± 33,0	75,8 ± 28,0
	Hunter River	245 ± 4	332 ± 10	72,4 ± 11,8a	201,6 ± 38,9	114,3 ± 28,0
	Rangelander	250 ± 9	320 ± 33	122,9 ± 9,9ab	232,1 ± 42,7	108,1 ± 41,2
C	Alexis	231 ± 7	263 ± 8	145,8 ± 23,2a	253 ± 29,5	57 ± 23,2
	Nexus	238 ± 7	294 ± 10	169,7 ± 1,3ab	282,8 ± 34,2	66 ± 24,0
	Live	235 ± 5	262 ± 5	149,2 ± 1,7a	239,1 ± 21,9	75 ± 19,9
	Lavo	249 ± 7	275 ± 9	214,5 ± 10,3b	300,3 ± 36,2	53,2 ± 13,6
	Hunter River	243 ± 6	275 ± 22	124,3 ± 7,4a	194,5 ± 37,9	117,1 ± 12,1
	Rangelander	251 ± 8	293 ± 25	139,3 ± 10,5a	211,3 ± 30,0	92,6 ± 29,7
D	Alexis	200 ± 19	179 ± 10	61,5 ± 14,2	71,2 ± 17,5	173,4 ± 18,3
	Nexus	184 ± 0	146 ± 7	48,4 ± 4,7	59,7 ± 4,8	77,3 ± 13,4
	Live	207 ± 2	154 ± 22	52,8 ± 22,2	69 ± 2,2	126 ± 66,6
	Lavo	200 ± 1	181 ± 1	56,2 ± 3,4	80,9 ± 3,0	139 ± 20,4
	Hunter River	188 ± 5	165 ± 7	45,8 ± 9,6	57,6 ± 8,6	155,7 ± 15,3
	Rangelander	192 ± 1	163 ± 22	51,6 ± 8,5	69,7 ± 12,4	119,9 ± 26,9

6 Tulosten tarkastelu

6.1 Karaistuminen

Karaistumisjakson alettua 22.9. peltokokeessa sää lämpeni uudelleen ja kaikki saavutettu karaistuminen purkaantui. Nettokaraistumista kertyi negatiivisena aina 8.11. saakka, minkä jälkeen karaistumista alkoi taas kertyä. Karaistumisjakson lopuksi nettokaraistumista oli kertynyt alun negatiivisen kertymän takia kuitenkin vain +0,5 °C.

Bélangerin ym. (2002) karaistumismallissa oletettiin, että kaikki syksyllä karaistumiskauden aikana kertynyt yli +5 °C lämpötilasumma kumoo karaistumisen ja on vähennettävissä alle +5 °C lämpötilasummasta. Korhonen (2014) kuitenkin totesi ettei negatiivisen nettokaraistumisen kertyminen karaistumisjakson alussa estänyt nurmiheinien myöhempää karaistumista. Voidaankin ajatella talvehtimisen onnistumiseen vaikuttaneen karaistumisen alkaneen vasta 9.11., mistä alkaen karaistumisjakson lopussa karaistumisen nettokertymä oli yhteensä 40,6 °C.

Peltokokeen kylmätesteissä syksyn karaistuminen näkyi selvästi. Lokakuussa kaikkien lajikkeiden keskimääräinen ionivuoto oli -10, -12 ja -14 °C testilämpötiloissa yli kaksinkertainen joulukuun mittaukseen verrattuna. Vaikka karaistumisjakso oli alkanut jo kolme viikkoa ennen lokakuun näytteenottoa, sää oli lämmennyt sen jälkeen ja kaikki laskennallisesti kertynyt karaistuminen oli purkautunut. Joulukuussa ionivuodot olivat pienimmillään, mikä kertoo karaistumista tapahtuneen ja sen olleen syvimmillään, vaikka yhteenlaskettu nettokertymä olikin vain +0,5 °C. Tämä tukee näkemystä siitä, että todellisen karaistumisen voidaan katsoa alkaneen vasta 9.11. Talven edetessä karaistuminen alkoi purkaantua ja ionivuodot suurenvat kevättä kohti. Maaliskuussa vuorokauden keskilämpötila oli pitkään 0 °C yläpuolella, mikä nopeutti karaistumisen purkautumista. Syysviljoilla onkin todettu, että karaistumisen purkautumisen kesto voi olla jopa tärkeämpi talvenkeston tekijä, kuin kylmänkesto (Rapacz ym. 2017). Tässä kokeessa kasvit kuitenkin talvehtivat hyvin, sillä ainoastaan kahdessa koeruudussa havaittiin vähäisiä talvituhoja, toisessa 2% ja toisessa 5%. Karaistumisen lisäksi lumipeite suojasi kasveja kovimmilta pakkasilta.

Kasvatuskaappikokeessa karaistumiskäsittelyt pysäyttivät kasvien kasvun käytännössä kokonaan. Kasvun pysähtyminen tapahtuukin luonnossa jo ennen karaistumisprosessin alkua (Sakai ja Larcher 1987). Kokeessa kasvit siirrettiin kasvihuoneoloista suoraan karaistumiskäsittelyihin, toisin kuin luonnossa, jossa päivä lyhenee tasaisesti ja ilma viilenee yleensä vähemmän äkkinäisesti. Niinpä kasvun pysähtymistä ennen varsinaista karaistumisen alkua ei voitu erottaa omana vaiheenaan.

Karaistumisen vaikutus näkyi selkeästi ionivuotokokeessa useimmissa testilämpötiloissa sekä lehtikiekoissa että juurissa. Kaksivaiheinen ja kylmempi karaistumiskäsittely C (2 viikkoa 7/3 °C:ssa jonka jälkeen 1 viikko 5/-2 °C:ssa) sai

aikaan syvemmän karaistumisen kuin yksivaiheinen käsittely B (3 viikkoa 7/3 °C:ssa), mikä näkyi pienempinä ionivuotoina. Tämä vastaa Castonguayn ym. (1993) sinimailasella tekemiä havaintoja ja vahvistaa niitä.

6.2 Kylmänkestävyys

Peltokokeen kylmätesteissä ”Lavo” osoittautui parhaiten kylmästressiä kestäväksi lajikkeeksi sekä kaikkien kuukausien keskiarvoissa, että yksittäisten kuukausien tuloksissa. Sen pieni ionivuoto verrattuna muihin lajikkeisiin korostui kaikkina kuukausina erityisesti kylmimmissä testilämpötiloissa. ’Alexiksen’ ionivuodot olivat kaikkina kuukausina puolestaan suurimmat. ’Nexus’ ja ’Live’ olivat tältä väliltä, ’Nexuksen’ muistuttaessa enemmän ’Alexista’ ja ’Liven’ ’Lavo’.

Kasvatuskaappikokeessa näiden lajikkeiden järjestys oli peltokoetta vastaava, vaikkakin useimmiten vain ’Lavo’ erosi merkitsevästi muista lajikkeista. ’Hunter riverin’ ionivuoto oli lähes aina korkein, mutta ero oli harvoin merkitsevä muihin kuin ’Lavoon’. ’Rangelanderin’ ionivuoto oli muiden lajikkeiden tasolla. Jalostajan mukaan ’Lavo’ on heidän kokeissaan osoittautunut ’Liveä’ paremmin talvenkestäväksi, mutta myös kasvunsa aiemmin syksyllä pysäyttäväksi (Petter Marum, Graminor, sähköpostiviesti 22.9.2015). Myös Winsemann Falghera (2016) havaitsi ’Lavon’ kasvutavaltaan muita tutkittuja lajikkeita (samat kuin tässä tutkimuksessa) maanmyötäisemmäksi ja kukinnaltaan myöhäisemmäksi, mikä viittaa pohjoiseen, kylmänkestävään ja hyvin syysdormanttiin tyyppiin. Ruotsin maatalousyliopiston lajikekokeessa ’Nexuksen’ satotaso oli toisen ja kolmannen vuoden ensimmäisissä niitoissa samaa luokkaa kuin ’Livellä’, mikä viittaa sen samansuuruisiin talvituhoihin eli myös samanlaiseen kylmänkestoon (Linda Öhlund, Lantmannen, sähköpostiviesti 11.12.2015). Yksittäisten kuukausien ionivuotokokeessa ja kasvatuskaappikokeessa nämä useimmiten eivät eronneetkaan toisistaan merkitsevästi, mutta koko vuoden keskiarvossa ’Liven’ ionivuoto oli ’Nexusta’ pienempi -10 ja -14 °C testilämpötiloissa. Ristiriitaisten tulosten takia voidaan ’Liveä’ siis pitää kylmänkestoltaan korkeintaan hieman ’Nexusta’ parempana. ’Hunter riverin’ muita korkeammat ionivuodot kertovat sen eteläisestä alkuperästä ja heikommasta kyvystä sietää jäätymistä sekä karaistuneena että karaistumattomana.

6.3 Kuiva-aineen kertyminen

Juurten kuiva-ainepitoisuus laski koko peltokokeen ajan, ollen huhtikuussa alimmillaan Kasvatuskaappikokeessa sekä karaistumiskäsittelyt, että kasvihuonekontrolli lisäsivät sekä juurten, että versojen kuiva-ainepitoisuutta verrattuna tilanteeseen ennen käsittelyjä. Syysvehnällä karaistuminen nostaa solukoiden kuiva-ainepitoisuutta, mutta se ei johdu veden vähenemisestä, vaan kuiva-aineen kertymisestä (Gusta ym. 1982). Kasvihuonekontrollissa kasviin kertyikin tärkkelystä, kun taas karaistumiskäsittelyssä yhteyttämistuotteet kertyivät sokereina, kuten myös Levitt (1980) totesi. Peltokokeessa puolestaan tärkkelystä kulutettiin talven mittaan sokeriksi ja sokeria energiaksi, minkä vuoksi kuiva-ainepitoisuus aleni kevättä kohti (Levitt 1980).

Versojen kuiva-ainepitoisuus nousi kevättä kohden, mikä selittyy versojen kuolemisella ja kuivumisella. Lokakuussa, kun versot olivat vielä eläviä, havaittiin ainoat merkitsevät erot lajikkeiden välillä, 'Alexiksen' kuiva-ainepitoisuuden ollessa muita lajikkeita alhaisempi. Muut lajikkeet olivat siis saattaneet karaistua 'Alexista' enemmän (Gusta ym. 1982). Versojen sokeripitoisuudessa ei kuitenkaan tällöin havaittu eroja merkinä karaistumisesta. Kasvatuskaappikokeessa kuiva-ainepitoisuuden lajike-eroja ei havaittu missään käsittelyssä juurissa eikä versoissa.

6.4 Liukoisten sokerien pitoisuus

Peltokokeessa juurten sokeripitoisuus nousi talven ajaksi, mutta keväällä aleni jälleen. Myös kasvihuonekokeessa sokeripitoisuus nousi karaistumiskäsittelyissä kasvihuonekontrolliin verrattuna. Sokeripitoisuuden nousu karaistumisen yhteydessä on tunnettu jo pitkään, esimerkiksi sinimailasella, puna-apilalla ja rohtomesikällä (*Melilotus officinalis* (L.) Pallas) (Bula ja Smith 1954). Castonguay ja Nadeau (1998) havaitsivat paitsi sokeripitoisuuden nousun sinimailasen kruunuissa karaistumisen yhteydessä, myös sen laskemisen talven lämpöjaksojen aikana. Kun lämpötila laski alemmas uudelleen sokeripitoisuuskin nousi jälleen (Castonguay ja Nadeau 1998). Lajikkeista ionivuodon perusteella kylmänkestävimmän 'Lavon' sokeripitoisuus oli suurin karaistumisen alkuvaiheesta lokakuusta helmikuuhun saakka (tosin lajikkeiden

väliset erot eivät olleet merkitseviä joulukuussa). Kasvatuskaappikokeessa juurien sokeripitoisuudessa ei havaittu lajike-eroja, mutta versojen sokeripitoisuus oli karaistumiskäsittelyssä B 'Lavolla' ja 'Alexiksella' 'Hunter riveriä' suurempi. Karaistumiskäsittelyssä C 'Lavon' lehtien sokeripitoisuus oli kaikkia muita lajikkeita, paitsi 'Nexusta' suurempi, muutoin lajikkeet eivät eronneet toisistaan. Myös Castonguay ym. (1995) ja Haagenson ym. (2003) havaitsivat eri sokerien pitoisuuden nousun karaistumisen yhteydessä ja se oli suurempi kylmänkestävillä kuin kylmänaroilla sinimailaslajikkeilla. Castonguay ym. (2011) havaitsivat kylmänkestävyyden perusteella valittujen sinimailaslinjojen kerryttävän enemmän liukoisia sokereita ja niistä erityisesti sakkaroosia, kuin niiden taustalla olleen vähemmän kylmää kestävän populaation. Sokeripitoisuuden epätarkkuus kylmänkeston ennustamiseen eri kasvilajien välillä on kuitenkin tunnettu jo pitkään (Levitt 1956, 1980), eivätkä Castonguay ym. (1995) pitäneet juurten sokeripitoisuutta riittävän hyvänä mittarina sinimailaslajikkeiden kylmänkestävyyksien arviointiin. Koska ionivuodon perusteella lajikkeet asettuivat peltokokeessa aina samaan järjestykseen ja kasvatuskaappikokeessakin useimmiten (vaikkei merkitseviä eroja aina löytynytäkään), mutta sokeripitoisuuksien järjestys vaihtui eri karaistumiskäsittelyissä, vahvistaa tämä tutkimus samaa käsitystä.

6.5 Tärkkelyspitoisuus

Peltokokeessa tärkkelyspitoisuus oli korkeimmillaan lokakuussa, eli tärkkelysvarastot oli jo kerrytetty suurimmilleen. Tämän jälkeen se väheni kevättä kohden, ollen huhtikuussa enää kahdeksasosa lokakuun pitoisuudesta. Tärkkelyspitoisuuden nopea lasku karaistumisen alettua havaittiin myös Bulan ja Smithin (1954) sekä Castonguayn ym. (1995, 2011) tutkimuksissa. Tärkkelystä siis käytettiin sokeripitoisuuden nostoon ja ylläpitoon (Castonguay ym. 2011). Haagenson ym. (2003) puolestaan havaitsivat huonosti talvea kestävien lajikkeiden tärkkelyspitoisuuden nousevan lokakuun ja joulukuun välisenä aikana, kun hyvin talvenkestävillä lajikkeilla se laski tässä vaiheessa. Tärkkelysvarastojen kerryttäminen liian pitkälle talvea kohti näyttääkin merkitsevän myöhäistä karaistumisen alkua, mikä heikentää talvenkestoa, koska riittävää kylmänkestävyyttä ei ole saavutettu ajoissa.

Kasvatuskaappikokeessa kasvihuonekontrollin juurten tärkkelyspitoisuus kasvoi yli kaksinkertaiseksi verrattuna käsittelyjen aloitushetkeen. Suotuisissa oloissa kasvit siis varastoivat energiaa tärkkelyksenä juuriinsa. Vastaavasti karaistumiskäsittelyissä tärkkelyspitoisuus laski, kun sitä hajotettiin sokereiksi, kuten havaitsivat myös Bula ja Smith (1954), Castonguay ym. (1995) ja Haagenson ym. (2003). Eri karaistumiskäsittelyjen välillä ei kuitenkaan ollut tärkkelyspitoisuudessa merkitsevää eroa. Sen sijaan sokeripitoisuus nousi merkitsevästi enemmän kaksivaiheisessa karaistumiskäsittelyssä C kuin yhden lämpötilan karaistumiskäsittelyssä B. Tämä johtuu karaistumisen monivaiheisuudesta; karaistuminen alkaa jo nollan yläpuolisissa lämpötiloissa, mutta vasta lämpötilan laskiessa pakkasen puolelle saavutetaan täysi karaistuminen (Levitt 1980, Sakai ja Larcher 1987, Castonguay ym. 1993)

Keväällä peltokokeessa juurten sokeripitoisuus aleni, mikä johtui karaistumisen purkautumisesta (Sakai ja Larcher 1987). Huhtikuussa lajikkeiden välillä ei havaittu merkitseviä eroja sokeripitoisuudessa, tärkkelystä sen sijaan oli 'Livellä' muita lajikkeita enemmän jäljellä. Tärkkelysvarastot eivät siis olisi riittäneet paljon pidempään korkean sokeripitoisuuden ja kylmänkeston ylläpitoon ainakaan muilla lajikkeilla, kuin 'Livellä'.

7 Johtopäätökset

Sekä pelto- että kasvatuskaappikoe osoittivat sopivien sinimailaslajikkeiden kestävän varsin kylmiäkin lämpötiloja, etenkin kunnollisesti karaistuneina. Lokakuussa peltokokeen kasvit olivat karaistuneet vasta hyvin vähän, jos ollenkaan, mutta -16 °C kylmäkäsittely ei riittänyt yhdenkään lajikkeen LT50-arvon saavuttamiseen. Myöhemminä kuukausina, kun karaistuminen oli syvempi, käytetty -18 °C kylmäkäsittely ei myöskään riittänyt tähän. Kasvatuskaappikokeessa osa lajikkeista saavutti 50% ionivuodon, lehdet lämpimämmässä, kuin juuret. Koska kaikilla karaistumiskäsittelyillä kaikki lajikkeet eivät kuitenkaan sitä saavuttaneet, ei LT50-arvoja määritetty. Sen sijaan kasvatuskaappikokeessa havaittiin kylmemmän ja kaksivaiheisen karaistumiskäsittelyn aiheuttavan vahvemman karaistumisen sekä juurille, että lehdille, kuin lämpimämmän yksivaiheisen saman kestoisen käsittelyn. Tämä vahvistaa aiempien tutkimuksien havaintoa siitä että täyden kylmänkestävyytensä

saavuttaakseen sinimailasen tulee altistua myös pakkasen puolelle laskeville lämpötiloille.

Juurten sokeripitoisuuden havaittiin nousevan kasvien karaistuessa niin pelto-oloissa, kuin kasvatuskaapissakin. Myös versoissa sokeripitoisuus nousi kasvien karaistuessa. Tämä vahvistaa aiempien tutkimuksien tuloksia. Pelto-oloissa 'Lavo' oli jo mahdollisesti alkanut karaistua lokakuussa, mikä selittäisi sen korkeampaa sokeripitoisuutta muihin lajikkeisiin verrattuna, mutta muutoin lajikkeiden väliset erot juurien sokeripitoisuudessa olivat vähäisiä. Tämän tutkimuksen mukaan sokeripitoisuuden perusteella ei voida tehdä kunnollisia päätelmiä lajikkeiden välisistä kylmänkestävyyden eroista, minkä aiemmatkin tutkimukset vahvistavat. Tärkkelys- ja kuiva-ainepitoisuuksien erot lajikkeiden välillä olivat vielä epäselvempiä. Sen sijaan karaistumisen aikana tapahtuva tärkkelyksen hajotus sokereiksi havaittiin selkeästi.

Lajikkeista 'Lavo' osoittautui selvästi kylmänkestävyydeltään parhaaksi. 'Liven' kylmänkesto vaihteli; hyvin karaistuneena sen ionivuoto oli useimmiten vain hieman 'Lavoa' suurempi, mutta kasvatuskaappikokeessa sen havaittiin karaistumattomana ja lämpimämmälle yksivaiheiselle karaistumiskäsittelylle altistettuna olevan ionivuodoltaan lähempänä muita lajikkeita, kuin 'Lavoa'. Hyvin karaistuneina muutkin lajikkeet eteläistä 'Hunter riveriä' lukuun ottamatta vaikuttivat kuitenkin selviävän hengissä kylmistäkin lämpötiloista. Tästä kertovat myös peltokokeen olemattomat talvituhot. On kuitenkin huomioitava, että pellolla oli kovimpien pakkasten aikaan myös lumipeite suojaamassa kasveja, joten vähälumisena talvena tilanne voisi olla toinen. Kuitenkin tämän tutkimuksen perusteella 'Lavo' voisi sopia Suomessa viljeltäväksi melko pohjoisessakin ja 'Live', 'Nexus' ja 'Alexis' ainakin eteläisempään Suomeen. 'Rangelander' muistutti kasvatuskaappioloissa 'Alexista' melko paljon, mutta ilman peltokoetta sitä ei varauksetta uskalla suositella. 'Hunter river' huonosti kylmää kestäväenä eteläisen tyypin lajikkeena ei sovellu Suomeen.

8 Kiitokset

Haluan kiittää ohjaajaani MMT Mervi Seppästä hyvistä neuvoista ja ohjauksesta, kannustuksesta ja kärsivällisyydestä tämän tutkielman teon kaikissa vaiheissa. Kiitokset myös MMT Venla Jokelalle ja MMT Hamid Khazaeille monista neuvoista ja avusta kokeiden käytännön toteutuksessa. Niin ikään haluan kiittää Maataloustieteiden laitoksen teknistä henkilökuntaa kasvihuoneella ja laboratorioissa suuresta avusta kokeiden toteuttamisessa.

LÄHTEET

- Adom, F., Maes, A., Workman, C., ClaytonNierderman, Z., Thoma, G. & Shonnard, D. 2012. Regional carbon footprint analysis of dairy feeds for milk production in the USA. *International Journal of Life Cycle Assessment* 17: 520-534.
- Barnes, D.K. & Sheaffer, C.C. 1995. Alfalfa. Teoksessa: R.F. Barnes, D.A. Miller & C.J. Nelson (toim.). *Forages*. Vol. 1, An introduction to grassland agriculture. 5. painos. Ames, IA: Iowa State University Press. s. 205-216.
- Belanger, G., Castonguay, Y., Bertrand, A., Dhont, C., Rochette, P., Couture, L., Drapeau, R., Mongrain, D., Chalifour, F.P. & Michaud, R. 2006. Winter damage to perennial forage crops in eastern Canada: causes, mitigation, and prediction. *Canadian Journal of Plant Science* 86: 33-47.
- Bélanger, G., Castonguay, Y. & Lajeunesse, J. 2014. Benefits of mixing timothy with alfalfa for forage yield, nutritive value, and weed suppression in northern environments. *Canadian Journal of Plant Science* 94: 51-60.
- Bélanger, G., Rochette, P., Castonguay, Y., Bootsma, A., Mongrain, D. & Ryan, D.A. 2002. Climate change and winter survival of perennial forage crops in eastern Canada. *Agronomy Journal* 94: 1120-1130.
- Bertrand, A., Castonguay, Y., Nadeau, P., Laberge, S., Rochette, P., Michaud, R., Bélanger, G. & Benmoussa, M. 2001. Molecular and biochemical responses of perennial forage crops to oxygen deprivation at low temperature. *Plant, Cell and Environment* 24: 1085-1093.
- Bula, R.J. & Smith, D. 1954. Cold resistance and chemical composition in overwintering legumes. *Agronomy Journal* 46: 397-401.
- Bula, R.J., Smith, D. & Hodgson, H.J. 1956. Cold resistance in alfalfa at two diverse latitudes. *Agronomy Journal* 48: 153-156.

- Buxton, D.R. 1996. Quality-related characteristics of forages as influenced by plant environment and agronomic factors. *Animal Feed Science and Technology* 59: 37-49.
- Bolton, J. L. 1962. Alfalfa, botany, cultivation and utilization. New York, USA: Interscience publishers inc. 474 s.
- Brouwer, D.J., Duke, S.H. & Osborn, T.C. 2000. Mapping genetic factors associated with winter hardiness, fall growth, and freezing injury in autotetraploid alfalfa. *Crop Science* 40: 1387-1396.
- Brummer, E. C., Shah, M. M. & Luth, D. 2000. Reexamining the relationship between fall dormancy and winter hardiness in alfalfa. *Crop Science* 40: 971-977.
- Castonguay, Y., Nadeau, P. & Laberge, S. 1993. Freezing tolerance and alteration of translatable mRNAs in alfalfa (*Medicago sativa* L.) hardened at subzero temperatures. *Plant and Cell Physiology* 34: 31-38.
- FAOSTAT 2016. Country indicators, Finland. Saatavissa internetistä: <http://www.fao.org/faostat/en/#country/67>. Viitattu 22.12.2016.
- Calder, F.W., MacLeod L.B. & Jackson L.P. 1965. Effect of soil moisture content and stage of development on cold-hardiness of the alfalfa plant. *Canadian Journal of Plant Science* 45: 211-218.
- Castonguay, Y., Bertrand, A., Michaud, R. & Laberge, S. 2011. Cold-induced biochemical and molecular changes in alfalfa populations selectively improved for freezing tolerance. *Crop Science* 51: 2132-2144.
- Castonguay, Y., Nadeau, P., Lechasseur, P. & Chouinard, L. 1995. Differential accumulation of carbohydrates in alfalfa cultivars of contrasting winterhardiness. *Crop Science* 35: 509-516.

- Castonguay, Y. & Nadeau, P. 1998. Enzymatic control of soluble carbohydrate accumulation in cold-acclimated crowns of alfalfa. *Crop Science* 38: 1183-1189.
- Danso, S.K.A., Hardarson, G. & Zapata, F. 1988. Dinitrogen fixation estimates in alfalfa-ryegrass swards using different nitrogen-15 labeling methods. *Crop Science* 28: 106-110.
- Dewhurst, R.J., Fisher, W.J., Tweed, J.K.S. & Wilkins, R.J. 2003. Comparison of grass and legume silages for milk production. 1. Production responses with different levels of concentrate. *Journal of Dairy Science* 86: 2598-2611.
- Dexter, S.T., Tottingham, W.E. & Graber, L.F. 1932. Investigations of the hardiness of plants by measurement of electrical conductivity. *Plant Physiology* 7: 63-78.
- Eagles, C.F., Thomas, H.F., Volaire, F. & Howarth, C.J. 1997. Stress physiology and crop improvement. Teoksessa: Christie B.R. (toim.). *Proceedings of the XVIII International Grassland Congress, Canada* 3: 141–150. Saatavissa internetissä: <http://www.internationalgrasslands.org/files/igc/publications/1997/iii-141.pdf>. Tulostettu 14.10.2014.
- Eurofins Viljavuuspalvelu oy. 2016. Viljavuustilastot. Saatavissa internetissä: <http://www.tuloslaari.fi/>. Tulostettu 10.6.2016.
- Frame, J., Charlton, J.F.L. & Laidlaw, A.S. 1998. Temperate forage legumes. Wallingford, UK: CAB International. 327 s.
- Gusta, L. V., Fowler, D. B. & Tyler, J. N. 1982. Factors influencing hardening and survival in winter wheat. Teoksessa: Li, P. H. & Sakai, A. (toim.). *Plant cold hardiness and freezing stress: Mechanisms and crop implications Volume 2*. New York, USA: Academic press inc. 694 s. 23-40.
- Gusta, L.V., Wisniewski, M., Nesbitt, N.T. & Tanino, K.T. 2003. Factors to consider in artificial freeze tests. *Acta Horticulturae* 618: 493-507.

- Haagenson, D.M., Cunningham, S.M. & Volenec, J.J. 2003. Root physiology of less fall dormant, winter hardy alfalfa selections. *Crop Science* 43: 1441-1447.
- Halling, M.A., Topp, C.F.E. & Doyle, C.J. 2004. Aspects of the productivity of forage legumes in Northern Europe. *Grass and Forage Science* 59: 331-344.
- Heichel, G.H., Barnes, D.K., Vance, C.P. & Henjum, K.I. 1984. N₂ fixation, and N and dry matter partitioning during a 4-year alfalfa stand. *Crop Science* 24: 811-815.
- Hodgson, H. J. 1964. Effect of photoperiod on development of cold resistance in alfalfa. *Crop Science* 4: 302-330.
- Jennings, J.A. & Nelson, C.J. 2002. Rotation interval and pesticide effects on establishment of alfalfa after alfalfa. *Agronomy Journal* 94: 786-791.
- Kaukovirta-Norja, A., Leinonen, A., Morkkila, M., Wessberg, N. & Niemi, J. 2015. Tiekartta Suomen proteiiniomavaraisuuden parantamiseksi. VTT Visions 6. Espoo: VTT. 69 s.
- Korhonen, P. 2014. Development of freezing tolerance and vernalisation in forage grasses in field experiments (2009–2013). *Kasvinviljelytieteen pro gradu-tutkielma*. Helsingin yliopisto, maataloustieteiden laitos. 64 s. Saatavissa internetissä: https://helda.helsinki.fi/bitstream/handle/10138/136163/ProGradu_Panu%20Korhonen.pdf?sequence=1. Viitattu 12.12.2016.
- Kunelius, H.T., Dürr, G.H., McRae, K.B. & Fillmore, S.A.E. 2006. Performance of timothy-based grass/legume mixtures in cold winter region. *Journal of Agronomy and Crop Science* 192: 159-167.
- Lanyon, L. E. & Griffith, W. K. 1988. Nutrition and fertilizer use. Teoksessa: A.A. Hanson, D.K. Barnes & R.R. Hill (toim.). *Alfalfa and Alfalfa Improvement*. Madison, WI: American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America. 1084 s. 333-372.

- Ledgard, S. F. & Steele K. W. 1992. Biological nitrogen fixation in mixed legume/grass pastures. *Plant and Soil* 141: 137-153.
- Levitt, J. 1956. *The hardiness of plants*. New York, USA. Academic Press Inc. 278 s.
- Levitt, J. 1980. *Responses of plants to environmental stresses*. 2. painos. New York, USA. Academic Press Inc. 497 s.
- Lindén, L., Palonen, P., Seppänen, M. & Väinölä, A. 1999. Cold hardiness research on agricultural and horticultural crops in Finland. *Agricultural and Food Science in Finland* 8: 459-477.
- McKenzie, J.S., Paquin, R. & Duke, S.H. 1988. Cold and Heat Tolerance. Teoksessa: A.A. Hanson, D.K. Barnes & R.R. Hill (toim.). *Alfalfa and Alfalfa Improvement*. Madison, WI: American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America. 1084 s. 259-302.
- Megazyme 2017a. Mega-Calc. Ladattavissa internetistä https://secure.megazyme.com/files/Data_Calculator/K-TSTA_CALC.xls. Viitattu 26.4.2017.
- Megazyme 2017b. Total starch assay procedure. Saatavissa internetistä https://secure.megazyme.com/files/Booklet/K-TSTA_DATA.pdf. Viitattu 26.4.2017.
- Michaud, R., Lehman, W. F. & Rumbaugh, M. D. 1988. World Distribution and Historical Development. Teoksessa: A.A. Hanson, D.K. Barnes & R.R. Hill (toim.). *Alfalfa and Alfalfa Improvement*. Madison, WI: American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America. 1084 s. 25-91.
- MTT 2013. Rehutaulukot ja ruokintasuositukset (verkkojulkaisu). Jokioinen: MTT. Saatavissa internetissä: <http://www.mtt.fi/rehutaulukot>. Viitattu 3.6.2016.

- Nyfelner, D., Huguenin-Elie, O., Suter, M., Frossard, E. & Lüscher, A. 2011. Grass-legume mixtures can yield more nitrogen than legume pure stands due to mutual stimulation of nitrogen uptake from symbiotic and non-symbiotic sources. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 140: 155-163.
- Palta, J. P. 1989. Plasma membrane ATPase as a key site of perturbation in response to freeze-thaw stress. *Current Topics in Plant Biochemistry and Physiology* 8: 41-68.
- Rapacz, M., Jurczyk, B. & Sasal, M. 2017. Deacclimation may be crucial for winter survival of cereals under warming climate. *Plant Science* 256: 5-15.
- Sakai, A. & Larcher, W. 1987. Frost survival of plants : responses and adaptation to freezing stress. Berlin, Germany: Springer-Verlag. 321 s.
- Small, E. 2011. Alfalfa and Relatives: Evolution and classification of *Medicago*. Ottawa, Ontario, Canada: NRC Research Press. 727 s.
- Sturlúðottir, E., Brophy, C., Bélanger, G., Gustavsson, A.-M., Jørgensen, M., Lunnan, T. & Helgadóttir, A. 2013. Benefits of mixing grasses and legumes for herbage yield and nutritive value in Northern Europe and Canada. *Grass and Forage Science* 69: 229-240.
- Teasar, M. B. & Marble V. L. 1988. Alfalfa Establishment. Teoksessa: A.A. Hanson, D.K. Barnes & R.R. Hill (toim.). Alfalfa and Alfalfa Improvement. Madison, WI: American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America. 1084 s. 303-332.
- Teuber L.R., Taggard, K.L., Gibbs, L.K., McCaslin, M.H., Peterson, M.A. & Barnes D.K. 1998. Standard Tests to Characterize Alfalfa Cultivars. Fall dormancy. <http://www.naaic.org/stdtests/dormacy2.pdf>. NAAIC. Julkaistu Elokuussa 1998, viitattu 1.5.2017.

- Thapa, B., Arora, R., Knapp, A. D. & Brummer E. C. 2008. Applying freezing test to quantify cold acclimation in *Medicago truncatula*. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 133: 684-691.
- Thompson, D. J. 2013. Yield and nutritive value of irrigated tall fescue compared with orchardgrass: In monocultures or mixed with alfalfa. *Canadian Journal of Plant Science* 93: 799-805.
- Toivonen, T. 2014 Nurmikasvien väliset erot syyskasvussa. Kasvinviljelytieteen pro gradu- tutkielma. Helsingin yliopisto, maataloustieteiden laitos. 70 s. Saatavissa internetissä <https://helda.helsinki.fi/bitstream/handle/10138/144434/Gradu%20Tiina%20Toivonen.pdf?sequence=1>. Viitattu 18.9.2017.
- Trunova, T. I. 1982. Mechanism of winter wheat hardening at low temperature. Teoksessa: Li, P. H. & Sakai, A. (toim.). *Plant cold hardiness and freezing stress: Mechanisms and crop implications Volume 2*. New York, USA: Academic press inc. 694 s. 23-40.
- Trunova, T. I. 1987. Winter wheat frost hardiness and protein synthesis at chilling temperatures. Teoksessa: Li, P. H. (toim.). *Plant Biology vol. 5: Plant Cold Hardiness*. New York, USA: Alan R. Liss Inc. 381 s. 43-57.
- Wang ChengZhang, Ma, B.L., Yan XueBing, Han JinFeng, Guo YuXia, Wang YanHua & Li Ping 2009. Yields of alfalfa varieties with different fall-dormancy levels in a temperate environment. *Agronomy Journal* 101: 1146-1152.
- Wang ZhiFeng, Li ZhiJian, Yang YunFei, Zhu JianLing, Zhang LiJuan, Liu YanMei & Wang, J. 2014. Relationships of cold resistance and soluble carbohydrates in nine alfalfa cultivars in northern China. *Journal of Food, Agriculture & Environment* 12: 526-530.
- Vance, C. P., Heichel, G. H. & Phillips, D. A. 1988. Nodulation and symbiotic dinitrogen fixation. Teoksessa: A.A. Hanson, D.K. Barnes & R.R. Hill (toim.). *Alfalfa and Alfalfa Improvement*. Madison, WI: American Society of Agronomy,

- Crop Science Society of America, Soil Science Society of America. 1084 s. 229-257.
- Wanner, L. A. & Junttila, O. 1999. Cold-induced freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 120: 391-399.
- Weishaar, M. A., Brummer, E. C., Volenec, J. J., Moore, K. J. & Cunningham, S. 2005. Improving winter hardiness in nondormant alfalfa germplasm. *Crop Science* 45: 60-65.
- Winsemann Falghera, L. 2016. Responses of different cultivars of *Medicago sativa* to temperature and photoperiod. *Kasvinviljelytieteen pro gradu- tutkielma*. Helsingin yliopisto, maataloustieteiden laitos.
- Wivstad, M., Mårtensson, A.M. & Ljunggren, H.D. 1987. Field measurement of symbiotic nitrogen fixation in an established lucerne ley using ^{15}N and an acetylene reduction method. *Plant and Soil* 97: 93-104.
- Yemm, E.W. & Willis A.J. 1954. The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. *Biochemical Journal* 57: 508-514.
- Zhao, M., Liu, W., Xia, X., Wang, T. & Zhang, W. 2014. Cold acclimation-induced freezing tolerance of *Medicago truncatula* seedlings is negatively regulated by ethylene. *Physiologia Plantarum* 152: 115-129.